

8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan (zie C1 en C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De commissie heeft de aanvrager verzocht de keuze voor de te gebruiken diermodellen beter te onderbouwen, aangezien beide modellen matig ongerief voor de dieren veroorzaken en het bovendien nodig is om bij 10% van de dieren een humaan eindpunt toe te passen. Ook was niet duidelijk in hoeverre de systemische ontstekingen in het LPS-model verstorend zouden kunnen werken op de resultaten. De antwoorden van de aanvrager hebben de commissie overtuigd van de validiteit van beide diermodellen. De onderzoekers hebben veel ervaring met beide modellen in de context van nieronderzoek.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. In de aanvraag wordt, om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. Aan het einde van de proef zullen de dieren solitair gehuisvest worden in metabole kooien gedurende 18 uur. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden(en): Gedurende deze periode zal urine verzameld worden om de mate van proteïnurie te kunnen bepalen, een belangrijke uitlees parameter van de experimenten. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn en dat deze bepaling niet op een andere wijze kan worden uitgevoerd.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het induceren van nierschade met LPS of met anti-GBM. Daarnaast wordt ongerief veroorzaakt door bloedafnames, beenmerg transplantatie, de solitaire huisvesting in metabole kooien, het induceren van macrofagen in de buikholte met thioglycolaat, en ontstaat ongerief ten gevolge van het ontbreken van CTSL. Het merendeel van de dieren zal daardoor matig ongerief ondergaan (1032 van de maximaal 1430 dieren). De overige dieren zullen licht ongerief ervaren. De commissie merkt hierbij wel op dat zij zich heeft gebaseerd op de aantallen die in de NTS worden gegeven, omdat het lastig is om deze aantallen na te volgen aan de hand van de informatie in de bijlagen.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. De dieren die door een genetisch defect het gen CTSL missen zullen een aangetast fenotype hebben dat kan resulteren in huidaandoeningen en mogelijk blindheid. Door de dieren in de experimenten te gebruiken voordat deze afwijkingen



manifest worden zal dit zoveel mogelijk worden voorkomen, maar kan niet worden uitgesloten dat 20% van deze dieren een licht aangetast fenotype zullen hebben waardoor zij gehinderd worden in hun normale gedrag en de zelfredzaamheid afneemt. De commissie is echter van oordeel dat bij de experimenten met deze dieren het ongerief veroorzaakt door het induceren van nierfalen in de ethische afweging op de voorgrond dient te staan. Voor het overige is er geen sprake van een aantasting van de integriteit.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met de gebruikte nierschade modellen ingeschat en zal maximaal 10% zijn. Voor de dieren die geen CTSL gen hebben is de inschatting dat 20% van deze dieren het humane eindpunt zal bereiken. In alle gevallen zal zorg worden gedragen dat de dieren nooit meer dan matig ongerief zullen ervaren. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om de mechanismen van HPSE1 gemedieerde sensitiviteit van niercellen en immuuncellen en hun bijdragen aan het ontstaan van nierschade te kunnen bestuderen is het nodig dit in een intact organisme te onderzoeken. Waar mogelijk zullen experimenten *in vitro* worden uitgevoerd.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door bij voorkeur te gaan werken met het LPS-model zullen zo min mogelijk dieren worden gebruikt. Het anti-GBM model heeft twee maal zoveel dieren nodig om tot dezelfde resultaten te komen. Daarnaast zullen voor elk experiment power berekeningen worden uitgevoerd om te bepalen met welk minimum aantal dieren nog goede resultaten kunnen worden verkregen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren zullen wanneer ze in metabole kooien worden gehuisvest in een ruimte met een verhoogde temperatuur geplaatst worden, omdat gedurende die periode bedding ontbreekt. De dieren die het CTSL gen missen zullen tijdig uit de proef genomen worden voordat er door dit defect matig ongerief optreedt. Ook zullen deze dieren aangepast voer krijgen en het op de bodem van de kooi aangeboden krijgen om te zorgen dat ze voldoende voedsel tot zich kunnen nemen. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: Mannelijke en vrouwelijke dieren verschillen in hun reactie op ontstekingsprocessen. De variatie die hierdoor ontstaat zal er toe leiden dat er een substantiële hoeveelheid extra dieren nodig is voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten.



Gezien het feit dat er in dit project gebruik gemaakt wordt van belastende diermodellen, meent de DEC dat het beperken van het aantal dieren in experiment vanuit ethisch gezichtspunt prioriteit verdient boven het beperken van het fokoverschot van vrouwelijke dieren. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. De aanvrager heeft aangegeven dat mogelijk de proeven herhaald zullen worden met vrouwelijke dieren. De DEC is er van uit gegaan dat deze herhaling met vrouwelijke dieren geen onderdeel is van het huidige project.

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

*NTS*

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

#### **D. Ethische afweging**

1. Rechtvaardigt het belang van het bestuderen van de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking, alsook het testen van interventie strategieën om HPSE1 te remmen, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een maximaal matige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).  
Voor de wetenschap is het onderzoek van belang omdat het meer kennis zal opleveren over de rol van HPSE1 bij het ontstaan van nierfalen (onder meer door kennis van het effect van sensitisatie van nier- en immuuncellen). Voor patiënten is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het uiteindelijk kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Nierfalen komt bij 10% van de bevolking wereldwijd voor. Deze patiënten zijn afhankelijk van niervervangende therapie zoals dialyse en niertransplantatie. Nierfalen heeft een grote impact op de patiënten en hun directe omgeving. Veel patiënten hebben nauwelijks baat bij de huidige therapieën. De resultaten van dit project zullen op den duur kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor deze mensen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor nierfalen van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het bestuderen van de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde



sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking als ook het testen van interventie strategieën om HPSE1 te remmen. Het uiteindelijke doel daarvan is nieuwe therapieën te ontwikkelen voor nierfalen bij de mens. Nierfalen is een ernstige aandoening die wereldwijd voorkomt bij 10% van de bevolking. De huidige behandeling is niervervangende therapie zoals dialyse en niertransplantatie. Dat zijn ingrijpende behandelingen voor terminaal nierfalen. Als dat voorkomen kan worden met effectieve therapie voordat terminaal nierfalen optreedt is daarvan veel winst voor patiënten en maatschappij te behalen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

#### E. Advies

##### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

##### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



## Form

**Project proposal**• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300202114613
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project



### 3.1 Background

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

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

Proteïnurie is de aanwezigheid van een te grote hoeveelheid eiwit in de urine. Proteïnurie is één van de eerste kenmerken van nierschade en daarnaast ook een onafhankelijke risicofactor voor progressie naar nierfalen (1). Er zijn meerdere oorzaken voor het ontstaan van proteïnurie waaronder een veel voorkomende nierfilterontsteking is. Bij het ontstaan van nierfilterontsteking wordt er schade aangebracht aan het nierfilter, welke bestaat uit glomerulaire endotheelcellen met een dikke suikerlaag (glycocalyx), de glomerulaire basaalmembraan (GBM) en podocyten. Alle lagen van dit nierfilter dienen intact te zijn voor een normale filterfunctie.

Heparan sulfaat (HS) is een negatief geladen polysaccharide dat aanwezig is in alle lagen van het nierfilter. Door zijn negatieve lading speelt HS een belangrijke rol in de ladingsafhankelijke permeabiliteit van het nierfilter. Dit is ook terug te zien in verschillende patiënten en diermodellen waarin de expressie van HS in het nierfilter sterk is verminderd in geval van proteïnurie (2). De afname van HS-expressie en de daaraan gecorreleerde proteïnurie is geassocieerd met een verhoogde expressie van heparanase 1 (HPSE1), een enzym dat verantwoordelijk is voor afbraak van HS (3-5). In de afgelopen jaren hebben wij aangetoond dat HPSE1 essentieel is voor het ontstaan van proteïnurie en uiteindelijk nierschade in diermodellen voor nierfilterontsteking (6, 7). Ondanks dat het een geaccepteerd feit is dat glomerulair HPSE1 een belangrijke rol speelt in het ontstaan van proteïnurie, bestaat er nog veel onduidelijkheid over de exacte bron van glomerulair HPSE1. Naast glomerulaire cellen zoals glomerulaire endotheelcellen en podocyten kunnen ook immuuncellen, ondermeer macrofagen en neutrofielen, HPSE1 produceren en activeren. Verder is aangetoond dat depletie van macrofagen en neutrofielen een verlaagd risico geeft op proteïnurie en nierschade in modellen voor glomerulaire ziekten (8, 9). In recente studies is "sensitisatie" van macrofagen door HPSE1 aangetoond (10, 11). Sensitisatie houdt in dat immuuncellen, maar wellicht ook niercellen, sterker op een ontstekingsprikkel reageren in aanwezigheid van HPSE1 dan in afwezigheid van HPSE1. Het is aannemelijk dat sensitisatie de mate van proteïnurie en nierfilterontsteking versterkt. Er wordt gedacht dat de receptoren TLR2 en TLR4 een rol spelen in deze HPSE1 gemedieerde sensitisatie, omdat TLR2 en TLR4 heparansulfaat-fragmenten kunnen binden (12, 13).

HPSE1 wordt geproduceerd in een inactieve vorm (pro-HPSE1) waarvan bekend is dat het signalerende activiteiten heeft. Echter, verwacht wordt dat niet pro-HPSE1 maar het enzymatisch actieve HPSE1, welke geactiveerd wordt door cathepsin L (CTSL), van belang is in HPSE1 gemedieerde sensitisatie. Indirect is CTSL daardoor ook betrokken bij HPSE1 gemedieerde sensitisatie, en wellicht draagt CTSL daardoor bij aan de mate van proteïnurie en nierfilterontsteking (14).

Momenteel zijn de therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van proteïnurie beperkt en onvoldoende effectief. Het is dan ook uitermate belangrijk om nieuwe therapieën te ontwikkelen voor de behandeling van proteïnurie. Aangezien HPSE1 een prominente rol speelt in het ontstaan van proteïnurie, is het een uitgelezen therapeutisch target om proteïnurie en nierschade te verminderen en/of voorkomen. Het is echter nog niet duidelijk op welke cellen (glomerulaire cellen of immuuncellen) een HPSE1 gerichte therapie het best zou kunnen worden gericht. Kennis over de mate waarin verschillende cellen (glomerulaire cellen versus immuuncellen) een rol spelen in productie/activatie van HPSE1 in de glomerulus zal bijdragen aan het ontwikkelen van meer gerichte cel-specifieke therapieën waarin HPSE1 wordt geremd.

Naast cel-specifieke therapieën is het van belang om HPSE1 remmers te testen die systemisch kunnen worden toegepast. Momenteel zijn er enkele HPSE1 remmers in ontwikkeling die gebaseerd zijn op heparine. Echter, medicijnen gebaseerd op heparine hebben ongunstige bijwerkingen en kunnen zelf ook het immuunsysteem activeren en daardoor bijdragen aan het ontstaan van nierschade, waardoor het effect van op heparine gebaseerde HPSE1 remmers beperkt is. Een mogelijke fysiologisch relevante kandidaat voor HPSE1 remming is heparanase 2 (HPSE2), een structurele, maar inactieve, homoloog van HPSE1. Aangezien HPSE2 lichaamseigen is, zal deze, in tegenstelling tot op heparine gebaseerde HPSE1 remmers, niet leiden tot activatie van het

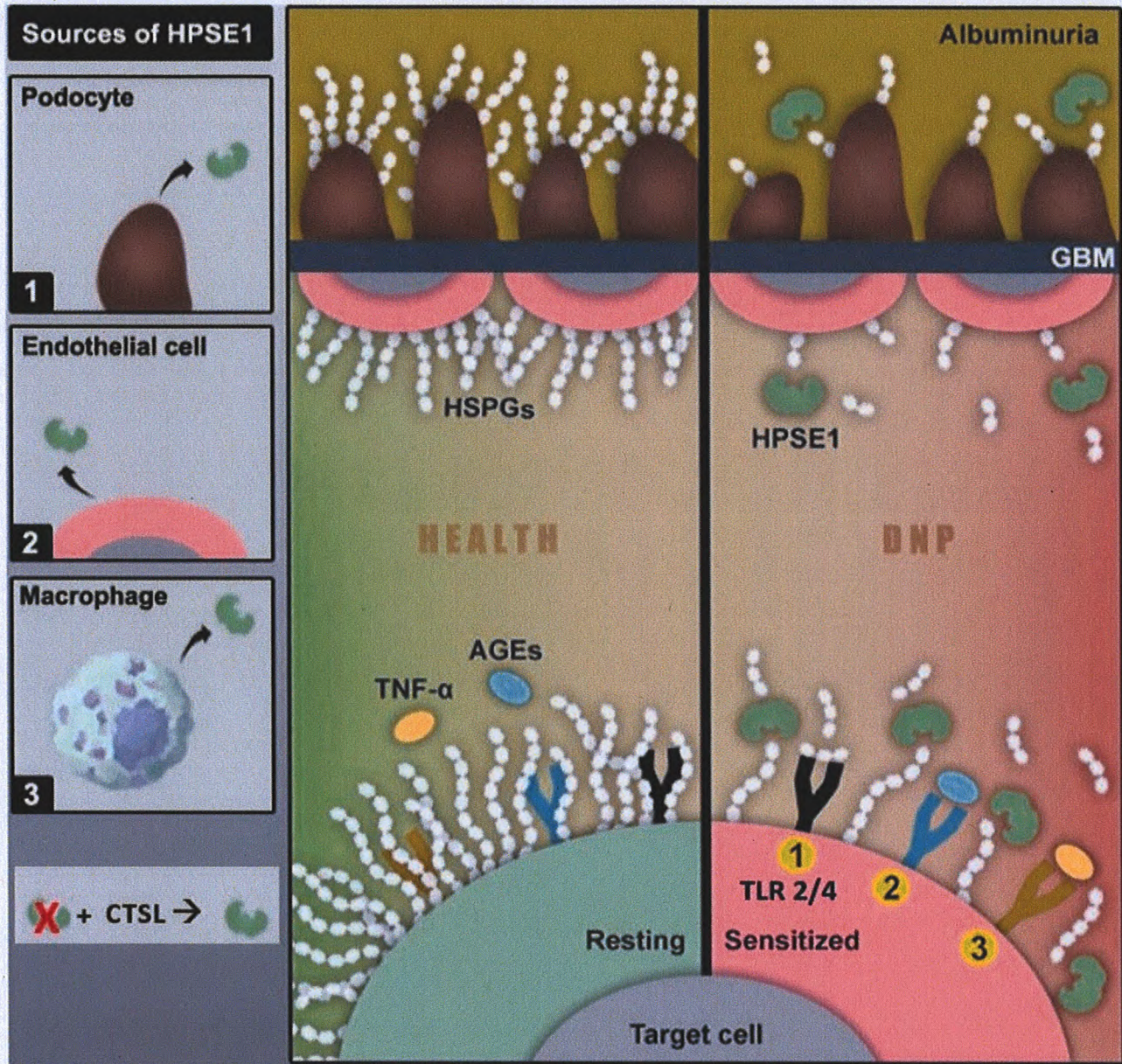


immuunsysteem. Zeer recent zijn HPSE2-deficiënte muizen ontwikkeld. Het feit dat deze HPSE2-deficiënte muizen proteïnurie ontwikkelen en sterven binnen één maand na geboorte suggereert dat aanwezigheid van HPSE2 in de nier erg belangrijk is om de ontwikkeling van proteïnurie en nierschade te voorkomen (15). In ons eigen vooronderzoek hebben wij laten zien dat zowel intact eiwit als peptides van HPSE2 een volledige bescherming geven op het gebied van nierschade in het LPS muis model (manuscript in voorbereiding) en dit beschermend effect van HPSE1 werd recent bevestigd door een andere groep (16). Daarnaast is de toepassing van glycosaminoglycaan (GAG) materiaal een veelbelovende op HPSE1 gerichte therapie voor nierfilterontsteking. Wij hebben *in vitro* al laten zien dat GAGs HPSE1 kunnen remmen, wat een mogelijke indicatie is voor toepassing van GAGs in bescherming van schade aan glomerulaire cellen. Het nut van GAGs werd bevestigd in een voorgaand muisonderzoek van onze afdeling waarin GAG-fragmenten tegelijk werden geïnjecteerd met anti-GBM konijn IgG waarna de muizen minder ziekte symptomen en inflammatie ontwikkelden (manuscript in voorbereiding). Aangezien ons recent *in vitro* onderzoek heeft aangetoond dat er grote verschillen zijn in de effectiviteit van HPSE1 remming tussen verschillende GAG-fracties, is het nu van belang om de systemische toediening van de meest potente GAG fracties te testen in bescherming tegen nierfilterontsteking in muizen.

Samenvattend, in dit onderzoek willen we eerst onderzoeken welke relatieve bijdragen glomerulaire cellen en immuuncellen hebben in de ontwikkeling van nierfilterontsteking door productie en activatie van HPSE1 in het nierfilter. Verder zal het onderliggende mechanisme nader worden onderzocht. Tot slot, willen we deze informatie gebruiken om het effect te bestuderen van gerichte HPSE1 remming in zowel glomerulaire cellen als immuuncellen, en dit vergelijken met het effect van systemische HPSE1 inhiberende behandeling.

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 sublethale LPS- geïnduceerde model en het anti-GBM-model. Zowel het anti-GBM als het sublethale LPS geïnduceerde nierfilterontstekingmodel zijn in de literatuur geaccepteerde modellen voor het induceren van nierfilterontsteking. 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. Deze twee modellen zijn verder geschikt omdat ze eerder succesvol door ons gebruikt zijn in volledige HPSE1 knock-out muizen en daardoor betrouwbare ziektemodellen zijn waarbij we precies weten waar we op moeten letten en wat we kunnen verwachten (6).





**Figuur 1: Grafische samenvatting van de moleculaire mechanismen die onderzocht zullen worden.** Verschillende type cellen (podocyten, endotheel cellen en macrofagen) kunnen een bron of target zijn voor HPSE1. In dit figuur is de target cel een endotheelcel, echter zouden dit ook podocyten of imuuncellen kunnen zijn aangezien er verwacht wordt dat er een samenwerking is tussen deze verschillende celtypes. In de gezonde toestand zijn de cellen bedekt met heparan sulfaat (afgebeeld als witte suiker ketens (HSPGs)). Deze heparan sulfaten worden afgebroken door HPSE1 na activatie door CTSL. Wanneer de heparan sulfaatketens zijn weggehaald van het celoppervlak kunnen de cellen worden gesensitiseerd door verschillende mechanisme: 1. Het binden van heparan sulfaat fragmenten aan TLR2/4 (aangetoond bij **receptor 1**); 2. Cytokines of andere activators zoals TNF $\alpha$  (cytokine) en AGEs (advanced glycosylation endproducts) die normaal aan HS binden en maar vrijkomen door HS afbraak door hPSE1, waardoor zij gemakkelijker aan hun receptoren (**receptor 2 en 3**) kunnen binden en de cellen gesensitiseerd worden door HPSE1; 3. Doordat de receptoren (**receptor 1,2 en 3 (maar ook vele andere)**) makkelijker bereikbaar zijn voor hun liganden, wanneer heparansulfaten zijn afgebroken door HPSE1.

### 3.2 Purpose



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

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

Het **hoofddoel** van dit onderzoek is inzicht krijgen in de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Daarnaast zal de verkregen informatie gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 om proteïnurie en nierschade te verminderen en/of te voorkomen.

Doelstelling **deexperiment A**: De bijdrage vaststellen van glomerulaire cellen versus immuuncellen in HPSE1 gerelateerde nierfilterontsteking en de rol van endogeen HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie. Dit zal worden onderzocht door middel van respectievelijk, muismodellen waarin of wel de glomerulaire cellen of wel de immuuncellen HPSE1 deficiënt zijn als in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van HPSE1 deficiënte muizen.

Doelstelling **deexperiment B**: De rol bestuderen van CTSL leidend tot enzymatisch actief HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van CTSL deficiënte muizen.

Doelstelling **deexperiment C**: De rol bestuderen van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking zowel in muismodellen waarin of wel de glomerulaire cellen of wel de immuuncellen TLR2/4 deficiënt zijn, en in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van TLR2/4 deficiënte muizen.

Doelstelling **deexperiment D**: Het effect onderzoeken van HPSE1 remming door verschillende systemische behandelingen, en cel-specifieke behandelingen van glomerulaire- en immuuncellen, met HPSE1 remmers in muismodellen voor nierfilterontsteking.

Dit project zal zowel fundamentele als translationele kennis opleveren die kunnen bijdragen aan toekomstige ontwikkeling van een meer gerichte therapie voor nierfilterontsteking middels HPSE1 remming. Binnen de projectduur is deze doelstelling realistisch en haalbaar vanwege de uitgebreide expertise binnen de projectgroep. Recent zijn de beoogde muismodellen gebruikt in de onderzoeksgroep voor gerelateerde projecten. Daarnaast worden de experimenten uitgevoerd in het Centraal Dieren Laboratorium (CDL), waar alleen ervaren, bevoegd en gecertificeerd personeel betrokken is bij de uitvoering van de betreffende handelingen. De gekozen proefopstelling is zodoende uitvoerbaar binnen de voorgenomen kaders.

### 3.3 Relevance

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

Momenteel leidt ongeveer 10% van de mensen wereldwijd (6,7% in Nederland) aan chronische nierziekten, waaronder nierfilterontsteking, welke kunnen leiden tot eindstadium nierfalen. Patiënten met nierfalen zijn momenteel volledig afhankelijk van niervervangende therapie, zoals dialyse en indien mogelijk niertransplantatie. De incidentie en prevalentie van chronische nierziekten is in de afgelopen jaren toegenomen en het is daardoor niet onwaarschijnlijk dat deze stijgende trend zal doorzetten. Dit zal enorme maatschappelijke consequenties hebben, ondermeer omdat de zorg voor deze patiëntencategorie zeer duur is. Het is daarom uitermate belangrijk om methoden te vinden die nierziekten kunnen voorkomen, dan wel de progressie naar eindstadium nierfalen kunnen uitstellen of voorkomen.

Proteïnurie is één van de eerste kenmerken van nierschade en tevens een onafhankelijke risicofactor voor de progressie naar nierfalen. De therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van proteïnurie zijn momenteel beperkt en onvoldoende effectief. Het is daarom van cruciaal belang dat er nieuwe therapeutische strategieën worden ontwikkeld voor de behandeling van proteïnurie. Om therapieën zo effectief mogelijk te maken is het belangrijk om een goed beeld te hebben van wat precies een rol speelt in de ontwikkeling van proteïnurie en welke celtypes hierbij betrokken zijn. Het wetenschappelijk belang van dit project is inzicht krijgen in de rol van glomerulaire cellen versus



immuuncellen in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en de daaruit voortvloeiende ontwikkeling van proteïnurie en nierschade. Daarnaast zal meer inzicht worden verkregen over het effect van HPSE1 remming zowel systemisch als cel-specifiek in glomerulaire cellen en immuuncellen. De uitkomst van dit project kan bijdragen aan de ontwikkeling van een effectieve therapie voor de behandeling van proteïnurie en daarmee nierfalen voorkomen.

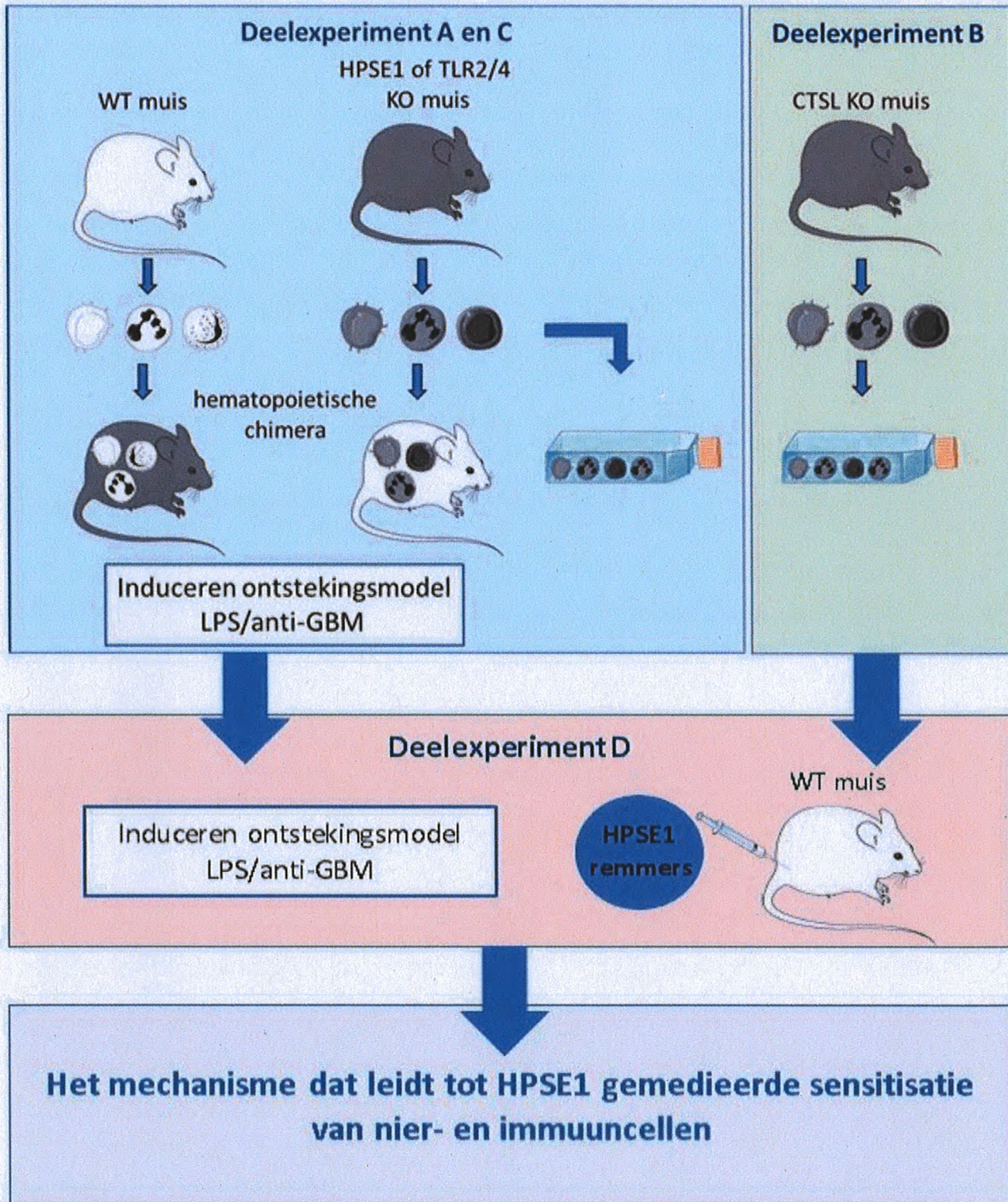
### **3.4 Research Strategy**

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

Zoals beschreven in sectie 3.2 is het **hoofddoel** van dit onderzoek inzicht krijgen in de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Daarnaast zal de verkregen informatie gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 om proteïnurie en nierschade te verminderen en/of te voorkomen. Om onze hoofddoelstelling te behalen, wordt dit project onderverdeeld in vier onderdelen (Figuur 1):

- (A)** Het bestuderen van de bijdrage van glomerulaire cellen versus immuuncellen in HPSE1 gerelateerde nierfilterontsteking en de rol van endogene HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie. Dit zal worden onderzocht in respectievelijk, muismodellen waarin of wel in de glomerulaire cellen of wel in de immuuncellen HPSE1 genetisch uitgeschakeld is en in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van HPSE1 deficiënte muizen.
- (B)** Het bestuderen van de rol van CTSL leidend tot enzymatisch actief HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van CTSL deficiënte muizen.
- (C)** Het bestuderen van de rol van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking zowel in muismodellen waarin of wel de glomerulaire cellen of wel de immuuncellen TLR2/4 deficiënt zijn, en in *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van TLR2/4 deficiënte muizen.
- (D)** Het bestuderen van het effect van HPSE1 remming door verschillende systemische behandelingen, en cel-specifieke behandelingen van glomerulaire- en immuuncellen, met HPSE1 remmers in muismodellen voor nierfilterontsteking. De verkregen resultaten zullen ook bijdrage aan een beter begrip van de rol van HPSE1 en HPSE1 remming in glomerulaire- en immuuncellen.





**Figuur 1: Flowchart van hoe de verschillende deelexperimenten samen naar het hoofddoel toewerken.** WT= wildtype; KO=knock-out

Het induceren van nierfilterontsteking kan op verschillende manieren. In dit onderzoek willen we gebruik maken van het LPS-model en het anti-GBM-model. Beide modellen zijn in de literatuur geaccepteerde modellen voor nierfilterontsteking. Tevens is het ongerief voor beide modellen voor de muizen vergelijkbaar. Echter, zijn er zowel voordelen als nadelen te benoemen voor beide modellen:

**Het sublethale LPS geïnduceerde nierfilterontstekingsmodel:**



**Voordelen:**

1. Het LPS-model is een systemisch model waarbij activatie van het immuunsysteem centraal staat, wat van belang zou kunnen zijn in deze studie aangezien we de response van zowel niercellen als immuuncellen bestuderen.
2. Het LPS-model is een model voor milde sepsis die gepaard gaat met ontsteking van de nierfilters en leidt tot nierschade. Sepsis geïnduceerde nierfalen komt zeer vaak voor bij mensen op de IC en is daardoor zeer relevant voor de humane situatie.
3. Het is een kort model (48 uur) waardoor ook tijdens de behandelingen de muizen minder injecties nodig hebben.

**Nadelen:**

1. Het model kan niet worden uitgevoerd in de experiment C aangezien TLR 2/4 de receptor is voor LPS.

**Het anti-GBM-model:****Voordelen:**

1. In tegenstelling tot het LPS-model, is het anti-GBM-model een nierspecifiek model en daardoor kan de data die hiermee wordt verkregen zelfs andere inzichten geven dan het LPS-model.

**Nadelen:**

1. Voor het induceren van het anti-GBM-model is anti-GBM-konijn IgG nodig 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 hoeveelheid anti-GBM-konijn IgG beschikbaar, welke genoeg is voor deze experimenten, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn).
2. Het anti-GBM model is een complex model waarin 2 fases optreden (eerst een granulocyten influx met een piek bij 2 uur en daaropvolgend nierschade die al waargenomen kan worden na 4 dagen); hierdoor moeten voor het anti-GBM model muizen geofferd moeten worden op meerdere tijdstippen om dezelfde hoeveelheid data te verkrijgen, zijn dus dubbel zo veel muizen nodig voor het anti-GBM-model in vergelijking tot het LPS-model.
3. Doordat het anti-GBM-model 96 uur duurt, zullen de muizen relatief vaak geïnjecteerd moeten worden voor de behandelingen in de experiment D.
4. Ondanks dat anti-GBM nierfilterontsteking voorkomt in mensen, is de incidentie relatief laag (17) in vergelijking met sepsis geïnduceerde nierfilterontsteking (18).

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

In dit project willen we inzicht krijgen in de rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 expressie/activiteit en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitisatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Daarnaast zal de hiervoor benoemde resultaten gebruikt worden in de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 om proteïnurie en nierschade te voorkomen. We hebben voor het diermodel voor nierfilterontsteking gekozen, omdat voor dit model is aangetoond dat HPSE1 activiteit essentieel is voor het ontstaan van proteïnurie en nierschade (6, 7).

In dit project zal worden gestart met **deexperiment A**, waarin we de bijdrage van glomerulaire cellen versus immuuncellen in HPSE1 gerelateerde nierfilterontsteking willen vaststellen door middel van hematopoietische chimera van wildtype en HPSE1 knockout muizen. Door te wisselen tussen wildtype muizen met beenmergtransplantatie van HPSE1 knockout muizen en HPSE1 knockout muizen met beenmergtransplantatie van wildtype muizen worden respectievelijk, muizen met wildtype glomerulaire cellen en HPSE1 knockout immuuncellen, en muizen met HPSE1 knockout glomerulaire cellen en wildtype immuuncellen gemaakt. Om het beenmerg te verkrijgen zullen zowel wildtype als knockout muizen worden geofferd en het beenmerg verzameld volgens standaardprocedures. De bestraling van de ontvanger muizen en de daaropvolgende beenmergtransplantatie voor het maken van de hematopoietische chimera's zal circa 1 week voor het introduceren van de nierfilterontsteking volgens standaard protocollen worden uitgevoerd. Door in deze muizen nierfilterontsteking te induceren door middel van LPS i.p of anti-GBM konijn IgG i.v injectie kan vervolgens de bijdrage van HPSE1, afkomstig van glomerulaire- en immuuncellen, aan



proteïnurie en nierschade worden vastgesteld. Muizen zullen worden geofferd 48 uur na LPS injectie en 2 uur en 4 dagen na anti-GBM konijn IgG injectie.

Verder willen we de bijdrage van endogeen HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen bestuderen. Dit zal worden gedaan door de immuuncellen van de HPSE1 knockout muizen te onderzoeken. 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. Peritoneale macrofagen worden verkregen door een eenmalige injectie i.p. met thioglycolaat waarna na 3-4 dagen de muizen worden geofferd en de immuuncellen worden verkregen door een buikspoeling met fysiologisch zout. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met *ex vivo* resultaten van deelexperiment B en deelexperiment C.

Voor **deelexperiment B**, waarin we de rol van CTSL leidend tot actief HPSE1 willen onderzoeken in HPSE1 gemedieerde sensitisatie zal alleen gekeken worden naar de immuuncellen van de CTSL knockout muizen. Zoals beschreven in deelexperiment A zullen de beenmergcellen van CTSL deficiënte muizen *ex vivo* worden gedifferentieerd tot macrofagen en gesensitiseerd met recombinant HPSE1. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels, willen we ook peritoneale macrofagen testen. Peritoneale macrofagen worden verkregen door een eenmalige injectie i.p. met thioglycolaat waarna na 3-4 dagen de muizen worden geofferd en de immuuncellen worden verkregen door een buikspoeling met fysiologisch zout. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met *ex vivo* resultaten van deelexperiment A en deelexperiment C.

Voor deelexperiment B moet een fok met ongerief worden gestart, waarover in het verleden toestemming is verleend. Momenteel worden de muizen in stand gehouden als heterozygote fok.

Voor **deelexperiment C**, waarin we de rol willen onderzoeken van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking zal gebruik worden gemaakt van zowel muismodellen waarin of wel in de glomerulaire cellen of wel in de immuuncellen TLR2/4 genetisch uitgeschakeld zijn als *ex vivo* sensitisatie modellen van cellen afkomstig van TLR2/4 deficiënte muizen. Net als beschreven voor deelexperiment A zullen hematopoietische chimeras worden gemaakt van wildtype en TLR2/4 knockout muizen om respectievelijk, muizen met wildtype glomerulaire cellen en TLR2/4 knockout immuuncellen, en muizen met TLR2/4 knockout glomerulaire cellen en wildtype immuuncellen te krijgen. Verder zal in deze muizen nierfilterontsteking worden geïnduceerd door middel van anti-GBM i.p injectie zoals beschreven onder deelexperiment A. Tevens zullen de muizen worden geofferd 2 uur en 4 dagen na anti-GBM konijnserum injectie. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met de *in vivo* resultaten van deelexperiment A.

Verder willen we de bijdrage van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen bestuderen. Dit zal worden gedaan door naar de immuuncellen van de TLR2/4 dubbel knockout muizen te kijken. Zoals beschreven bij deelexperiment A zullen de van de beenmergcellen *ex vivo* neutrofielen worden geïsoleerd en deze beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd verschillende immuuncellen waaronder 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, willen we ook peritoneale macrofagen testen. Peritoneale macrofagen worden verkregen door een eenmalige injectie i.p. met thioglycolaat waarna na 3-4 dagen de muizen worden geofferd en de macrofagen worden verkregen door een buikspoeling met fysiologisch zout. De resultaten van deze experimenten zullen worden vergeleken met *ex vivo* resultaten van deelexperiment A en deelexperiment B.

Voor **deelexperiment D**, waarin we het effect van systemische behandeling of cel-specifieke behandeling in glomerulaire- en immuuncellen met HPSE1 remmers in diermodellen voor nierfilterontsteking willen bestuderen, zal gebruik worden gemaakt van wildtype muizen. Deze



wildtype muizen zullen worden behandeld met systemische HPSE1 inhibitors zoals sulodexide en GAG formulaties, of nierspecifiek met HPSE2 eiwit/peptide/RNA. Alleen de 2 meest potente GAG formulaties op basis van onze *in vitro* testen zullen systemisch worden geïnjecteerd. Om nier-specifieke of immuuncel-specifieke behandeling te bereiken, zullen muizen worden behandeld met nanoparticles die gericht worden op glomerulaire cellen of immuuncellen. Deze nanoparticles zullen HPSE2 peptides/eiwit/of RNA bevatten.

Voor zowel de cel-specifieke behandelingen met HPSE2 eiwit/peptide/RNA als de systemische behandelingen met GAG formulaties zullen we eerst pilots doen met kleinere groepen muizen om op basis daarvan de juiste concentratie te bepalen voor het behandelen van een grotere groep muizen

Nierfilterontsteking zal worden geïnduceerd door middel van LPS injectie of anti-GBM konijnserum injectie zoals beschreven onder deelexperiment A. Tevens zullen de muizen worden geofferd 48 uur na LPS injectie, en 2 uur en 4 dagen na anti-GBM injectie.

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

**Deelexperiment A:** Allereerst wordt doormiddel van hematopoietische chimera's van wildtype en HPSE1 knockout dieren bepaald wat de bijdrage is van HPSE1 in glomerulaire cellen en immuuncellen in nierfilterontsteking.

**Decision point:** We zullen beginnen met het LPS model om nierfilterontsteking te induceren in de muizen. Mocht dit model geen eenduidige resultaten opleveren, dan zullen we alsnog het anti-GBM model toepassen om nierfilterontsteking te induceren. Het anti-GBM model is nierspecifiek maar ook veel kostbaarder gezien 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 hoeveelheid anti-GBM konijn IgG beschikbaar, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn). Indien genoeg en eenduidige informatie kan worden verkregen om met het LPS-model tot een conclusie te kunnen komen met betrekking tot de onderzoeksvraag, dan zal het anti-GBM-model niet meer worden uitgevoerd.

Verder zullen voor deelexperiment A *ex vivo* experimenten worden uitgevoerd om de rol van endogene HPSE1 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen te onderzoeken. Dit zal ook worden gedaan in deelexperiment B voor CTSL en deelexperiment C voor TLR2/4. Verwacht wordt dat HPSE1 gemedieerde sensitisatie ook *in vivo* plaats vindt. Deze *in vivo* HPSE gemedieerde sensitisatie zal worden bestudeerd door de immuuncellen en niercellen 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* sensitisatie experimenten. Samen zullen de *ex vivo* en *in vivo* resultaten van deelexperiment A, B en C een beter inzicht geven in het mechanisme van HPSE1 gemedieerde sensitisatie.

**Decision point:** Indien sensitisatie van beenmergcellen niet kan worden aangetoond in een initiële *ex vivo* pilot experimenten, zullen vervolgens niet alle muizen worden geofferd om beenmerg te verkrijgen. In dit geval zal enkel verder worden gegaan met peritoneale macrofagen.

**Deelexperiment B:** Er zal een fok zal worden opgezet om CTSL -/- muizen te krijgen. Momenteel wordt de fok in stand gehouden door +/- muizen. De fok willen we starten door +/- vrouwen te kruisen met -/- mannen en +/- mannen. Dit omdat de CTSL +/- vrouwen betere moeders zouden zijn dan de CTSL -/- vrouwen. De gefokte -/- muizen zullen worden gebruikt om de *ex vivo* sensitisatie experimenten mee uit te voeren. Deze experimenten zullen worden uitgevoerd in overeenstemming met de *ex vivo* experimenten van deelexperiment A en C en kunnen daarom worden vergeleken met elkaar.

**Decision point:** Indien sensitisatie van beenmergcellen niet kan worden aangetoond in een initiële *ex vivo* pilot experimenten, zullen vervolgens niet alle muizen worden geofferd om beenmerg te verkrijgen. In dit geval zal enkel verder worden gegaan met peritoneale macrofagen.

**Deelexperiment C:** Vervolgens wordt doormiddel van hematopoietische chimera's van wildtype en TLR2/4 dubbel knockout dieren bepaald wat de bijdrage is van TLR2/4 in glomerulaire cellen en immuuncellen in nierfilterontsteking. In deelexperiment C zal alleen het anti-GBM model worden gebruikt aangezien het LPS model niet kan worden gebruik in TLR2/4 knockout muizen aangezien



TLR2/4 de target is voor LPS en hierdoor het experiment niet de beoogde resultaten zal geven. Desondanks kunnen de resultaten van de *in vivo* experimenten van deelexperiment A en C worden vergeleken.

Verder zullen voor deelexperiment C *ex vivo* experimenten worden uitgevoerd om de rol van TLR2/4 in HPSE1 gemedieerde sensitisatie van immuuncellen te onderzoeken. Aangezien dit ook zal worden gedaan in deelexperiment A voor HPSE1 en deelexperiment B voor CTSL kunnen de *ex vivo* resultaten van deelexperiment A, B en C samen een beter inzicht geven in het mechanisme van HPSE1 gemedieerde sensitisatie.

**Decision point:** Indien sensitisatie van beenmergcellen niet kan worden aangetoond in een initiële *ex vivo* pilot experimenten, zullen vervolgens niet alle muizen worden geofferd om beenmerg te verkrijgen. In dit geval zal enkel verder worden gegaan met peritoneale macrofagen.

**Decision point:** De informatie verkregen in deelexperimenten A en C kunnen een indicatie geven over een effectieve behandeling door cel-specifieke HPSE1 remming. Mochten deelexperiment A en C aantonen dat cel-specifieke behandeling van alleen glomerulaire cellen of alleen immuuncellen een verbetering geeft in het nierfilterontstekings model, dan zal cel-specifieke behandeling van slechts deze cel types worden uitgevoerd in deelexperiment D.

**Deelexperiment D:** Ten slotte zullen wildtype dieren verschillende systemische behandelingen, en cel-specifieke behandelingen in glomerulaire- of immuuncellen, met HPSE1 remmers ontvangen in diermodellen voor nierfilterontsteking.

**Decision point:** We zullen beginnen met het LPS model om nierfilterontsteking te induceren in de muizen. Mocht de pilot van dit model geen eenduidige resultaten opleveren, dan zullen we alsnog beginnen met de pilot van het anti-GBM model toepassen om nierfilterontsteking te induceren. Op basis van de data verkregen met de pilot-experimenten en de eerdere deelexperimenten zullen we bepalen met welk model we verder gaan. Het anti-GBM model is nierspecifiek maar ook veel kostbaarder gezien 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 hoeveelheid anti-GBM konijn IgG beschikbaar, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn). Indien genoeg en eenduidige informatie kan worden verkregen om met het LPS-model tot een conclusie te kunnen komen met betrekking tot de onderzoeksvraag, dan zal het anti-GBM-model niet meer worden uitgevoerd.

De data verkregen van deelexperiment A (speelt HPSE1 vooral een rol in glomerulaire cellen of niercellen of beide?), deelexperiment B (is enzymatisch actief HPSE1 benodigd voor de HPSE1 gemedieerde sensitisatie?), deelexperiment C (speelt TLR2/4 vooral een rol in glomerulaire cellen of niercellen of beide? En wat is de rol in HPSE1 gemedieerde sensitisatie?) en deelexperiment D (het effect van celspecifieke remming van niercellen of immuuncellen versus systemische remming van HPSE1) geven samen een beter inzicht in de bijdrage/rol en het onderliggende mechanisme van de rol van glomerulaire- en immuuncellen in HPSE1 gemedieerde nierfilterontsteking.

#### Referenties:

1. Tryggvason K, Pettersson E. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *Journal of Internal Medicine*. 2003;254(3):216-24.
2. van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Weening JJ, et al. Distribution of GBM heparan sulfate proteoglycan core protein and side chains in human glomerular diseases. *Kidney Int*. 1993;43(2):454-63.
3. **10.2 .e. en g**

[Redacted content]



10.2 .e. en g

8. You H, Gao T, Cooper TK, Brian Reeves W, Awad AS. Macrophages directly mediate diabetic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(12):F1719-27.
9. Cao Q, Harris DC, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology (Bethesda)*. 2015;30(3):183-94.
10. Goldberg R, Sonnenblick A, Hermano E, Hamburger T, Meirovitz A, Peretz T, et al. Heparanase augments insulin receptor signaling in breast carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(12):19403-12.
11. 10.2 .e. en g
12. Blich M, Golan A, Arvatz G, Sebbag A, Shafat I, Sabo E, et al. Macrophage activation by heparanase is mediated by TLR-2 and TLR-4 and associates with plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):e56-e65.
13. Goodall KJ, Poon IKH, Phipps S, Hulett MD. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLOS ONE*. 2014;9(10):e109596.
14. 10.2 .e. en g
15. Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, et al. Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *J Biol Chem*. 2010;285(36):28010-9.
16. Kiyani Y, Tkachuk S, Kurselis K, Shushakova N, Stahl K, Dawodu D, et al. Heparanase-2 protects from LPS-mediated endothelial injury by inhibiting TLR4 signalling. *Scientific Reports*. 2019;9(1):13591.
17. McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(7):1162-72.
18. Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*. 2019;364:k4891-k.
19. Bisgaard LS, Mogensen CK, Rosendahl A, Cucak H, Nielsen LB, Rasmussen SE, et al. Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression – implications for atherosclerosis research. *Scientific Reports*. 2016;6(1):35234.

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	Deelexperiment A
2	Deelexperiment B
3	Deelexperiment C
4	Deelexperiment D





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
prof. dr. J.H.J.M. Van Krieken  
Postbus 9101  
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  
AVD10300202114613  
**Bijlagen**  
3

Datum 14 juni 2021  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte prof. dr. Van Krieken,

Op 4 maart 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Heparanase: a double-edged sword in the development of glomerulonephritis " met aanvraagnummer AVD10300202114613. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 14 juni 2021 tot en met 30 april 2025.

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

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie RU DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 26 april 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

#### *Nadere vragen aanvrager*

Op 21 mei 2021 en 4 juni 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het gebruik van beide geslachten, het cumulatieve ongerief en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.



**Overwegingen**

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

**Datum:**

14 juni 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD10300202114613

**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:**

14 juni 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD10300202114613

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**10.2 .e. en g**

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving





# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 juni 2021 tot en met 30 april 2025, voor het project "Heparanase: a double-edged sword in the development of glomerulonephritis " met aanvraagnummer AVD10300202114613, na advies van dierexperimentencommissie RU DEC . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 4 maart 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 Deelexperiment A, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
    - 3.4.4.2 Deelexperiment B, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
    - 3.4.4.3 Deelexperiment C, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
    - 3.4.4.4 Deelexperiment D, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 9 juni 2021;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 26 april 2021
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 4 juni 2021, 9 juni 2021.



Aanvraagnummer: AVD10300202114613

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.4.1 Deelexperiment A</b>			
	Muizen (Mus musculus) / C57Bl/6J HPSE1 wildtype of knockout (-/-), 8-18 weken	486	75,0% Matig 25,0% Licht
<b>3.4.4.2 Deelexperiment B</b>			
	Muizen (Mus musculus) / C57Bl/6J, CTSL knockout (-/-)	145	76,0% Matig 24,0% Licht
<b>3.4.4.3 Deelexperiment C</b>			
	Muizen (Mus musculus) / C57Bl/6J wildtype of TLR2/4 dubbel knockout (-/-), 8-18 weken	348	73,0% Matig 27,0% Licht
<b>3.4.4.4 Deelexperiment D</b>			
	Muizen (Mus musculus) / C57Bl/6J, 8-12 weken	424	93,0% Matig 7,0% Licht

#### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IVD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.





**Aanvraagnummer:**

AVD10300202114613

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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



**Aanvraagnummer:**

AVD10300202114613

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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





## **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 geëvalueerd. 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 consequentialistische (gevolgenethiek), het deontologische (beginsletheiek) en het deugdeethiek perspectief. Bij een consequentialistische 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.



**Form**

**Project proposal**

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

**1 General information**

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University
1.3	Provide the title of the project.	Gut feeling of chickens: exploiting the unique mechanism of digesta reflux to improve sustainability of poultry production

**2 Categories**

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



---

Higher education or training

Forensic enquiries

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

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

Poultry meat and eggs are sustainable and important protein sources for human nutrition. Their global demand is expected to be more than doubled by 2050 [1,2]. To avoid competition with resources for human consumption and energy production, poultry producers are urged to use more food waste and agricultural by-products in the future [3]. These products typically have a lower nutritional value due to their high fiber contents and poor protein digestibility.

A mechanism that is believed to facilitate efficient digestion of nutrients in birds, is reverse peristalsis of the intestine, causing digesta to flow in reverse direction; a phenomenon called reflux. Three major sites of reverse peristalsis in the digestive tract of birds are identified: (1) from the gizzard (the muscular stomach) to the proventriculus (glandular stomach), (2) from the small intestine into the gizzard and proventriculus, (3) from the cloaca through the colon into the ceca [4]. Reflux allows the bird to retain its digesta longer, so there is more time for degradation and absorption of nutrients. By distinctive intestinal contractions and filtering mechanisms, various fractions of the digesta can be diverged to different sections in the digestive tract [4,5]. In this way, digesta retention time can be adapted to the type of feed [6] and fibers, that cannot be digested by the bird itself, are delivered to the ceca to be fermented by microbes [7,8]. Also, reflux of urine from the cloaca to the ceca, represents a mechanism for recycling of urinary nitrogen (N) in a way analogous to urea recycling in mammals [9]. Microbes in the ceca can degrade this urinary-N and use the generated ammonia for protein synthesis. The resulting microbial biomass can potentially become available to the host as N-source [reviewed by 8,9].

Hence, reflux may be of particular importance to accommodate the above described shift in feed resources. To date, regulation of reflux is poorly understood, but likely involves mechanisms related to feed intake and dietary proteins and fibers. Particularly the role of various physicochemical properties of fibers is unclear. Furthermore, it can be questioned, whether the genetic reflux potential is conserved in modern poultry breeds. Selective breeding resulted in a four-fold increase in meat- and a two-fold increase in egg-production since 1950s [10,11], coinciding with a profound increase in feed intake and a shift towards the use of highly-digestible/low-fiber feed ingredients. Considering the role of fibers in the regulation of reflux, modern chicken's capability to utilize high-fiber resources could be compromised concurrently.

To conclude, optimizing reflux is pivotal to maintain efficient digestion when moving into an era of feeding high-fiber, low-quality feed ingredients to



poultry and understanding reflux is crucial to develop feeding and breeding programs for optimal exploitation of reflux. This requires understanding of the (dietary) regulation of reflux and the role of breed and age in its occurrence.

### References

1. Farrell, D. The role of poultry in human nutrition. Poultry development review. Rome, Italy: FAO; 2013.
2. Alexandratos, N., Bruinsma, J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper. Rome, Italy: FAO; 2012.3. Fenna, C., Boag, D.A. Filling and emptying of the galliform caecum. 1974. *Can J Zool*: 52, 537-40.
3. FAO. Food outlook. Global market analysis. [Website] 2011 [cited 2016 01-09-2016]; Available from: <http://www.fao.org/docrep/014/al981e/al981e00.pdf>.
4. Duke, G.E. Gastrointestinal motility and its regulation. 1982. *Poult Sci*: 61, 1245-56.
5. Fenna, C., Boag, D.A. Filling and emptying of the galliform caecum. 1974. *Can J Zool*: 52, 537-40.
6. Clench, M.H., Mathias, J.R.C. Intestinal transit: How can it be delayed long enough for birds to act as long-distance dispersal agents? 1992. *The Auk*: 109, 933-6.
7. Denbow, D. Gastrointestinal anatomy and physiology. 2000. *Sturkie's avian physiology*: 5, 299-325.
8. Józefiak, D., Rutkowski, A., Martin, S.A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. 2004. *Anim Feed Sci Technol*: 113, 1-15.
9. Singer, M.A. Do mammals, birds, reptiles and fish have similar nitrogen conserving systems? 2003. *Comp Biochem Physiol B*: 134, 543-58.
10. Zuidhof, M.J., Schneider, B.L., Carney, V.L., Korver, D.R., Robinson, F.E. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. 2014. *Poult Sci*.
11. Hocking, P.M., Bain, M., Channing, C.E., Fleming, R., Wilson, S. Genetic variation for egg production, egg quality and bone strength in selected and traditional breeds of laying fowl. 2003. *Br Poult Sci*: 44, 365-73.

### 3.2 Purpose

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

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

This project aims to elucidate the mechanisms of reflux in poultry and to quantify reflux and its role in nutrient digestion.

The sub-objectives are:

1. To compare reflux in chickens of modern and traditional breeds, when fed standard diets and diets composed of non-food-competing ingredients
2. To identify the role of dietary fiber in the regulation of reflux, by studying effects on digesta flow and rheological properties, i.e. properties determining flow behaviour, of the digesta, nitrogen recycling, and nutrient digestibility
3. To reveal preliminary insights in the genetic regulation of reflux

These objectives seem feasible as novel scanning and (stable isotope-)tracer techniques now allow the quantification of reflux and its contribution to the bird's nutrient supply.

### 3.3 Relevance



---

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

---

The findings of this project can be used to adapt feeding and breeding strategies for poultry, such that nutrient use of low-quality feed resources is optimized and use of food waste and by-products from food and biofuels in poultry diets can be increased. This will allow sustainable and competitive use of feed resources without compromising nutritional value for the bird.

### **3.4 Research Strategy**

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

The project will be performed in two phases (Fig. 1). **Phase 1** aims to get insight in the occurrence of reflux and its contribution to nutrient digestion in chickens in modern production systems, as well as the exploration of possible differences in genetic potential for reflux in traditional strains. To that end the occurrence of reflux with a highly-digestible/low-fiber diet representing current feeding practices (standard diet) and a poorly-digestible/high-fiber diet composed of non-food-competing ingredients (leftover diet) will be compared among chickens of modern and traditional layer- (experiment 1a; appendix 1) and meat- (experiment 1b; appendix 2) type strains. After experiment 1a, technical feasibility of experimental methods will be evaluated (**Decision moment 1**). If needed, experimental methods will be adjusted/optimized and the number of experimental animals for experiment 1b will be reconsidered and if possible reduced. If the 2D or 3D CT-scan method does not seem to be feasible, these measurements will be omitted from experiment 1b. If the 2D CT-method is successfully applied and validated in experiment 1a and b, this technique will be used in experiment 2b of phase 2 (appendix 4) to quantify digesta fluxes (**Decision moment 2**).

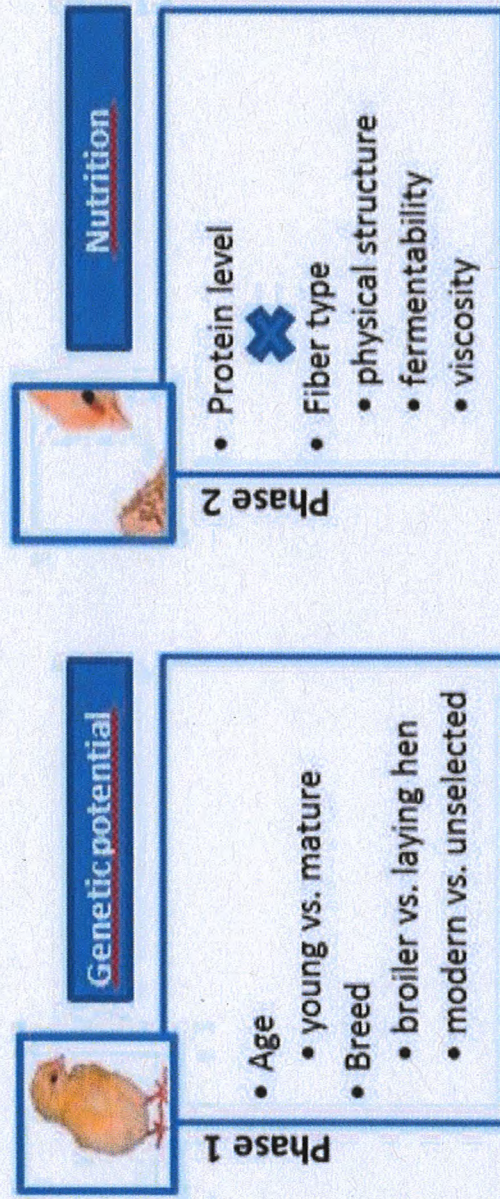
Results from phase 1 should identify if there are pronounced differences in the occurrence of reflux among chickens of various breeds and diets. Based on these results, the target genotype (broilers or laying hens) for phase 2 will be selected (**Decision moment 2**). Broilers are representing the greatest share in poultry production and feed consumption. However, it can be speculated that reflux may be less pronounced in broilers. Broilers and laying hens have been selected for different traits, which resulted in distinct differences in their digestive physiology. Broilers have longer small intestines and smaller ceca relative to their body weight, compared with laying hens[4]. In addition, management and feeding practices differ. Laying hens consume ~7% of their body weight in feed per day, whereas this is up to ~20% in young broilers. To facilitate such high feed intakes and achieve maximal growth and feed efficiency, broilers are subjected to long photoperiods with short periods of darkness (min 6h, of which min 4h consecutive in 24h). In contrast, laying hens are exposed to one continuous photoperiod of 12-16h in 24h, matching the light-dependent egg-formation cycle that takes approximately one day[5]. Gut motility seems to be dependent on feed intake and photoperiod[6, 7] and may differ between broilers and laying hens[8]. Possibly, the selection of broilers and laying hens under distinct feeding and photoperiodic regimes, may have affected expression of the genes involved in gut motility and reflux adversely. In the case that the occurrence of reflux turns out to be of greater relevance in laying hens, phase 2 will focus at laying hens as an alternative.

**Phase 2**, aims to identify fiber sources that can stimulate reflux. Dietary factors, such as feed consumption and dietary protein content, can affect the frequency and intensity of reverse peristalsis [1, 9]. Recent literature highlights the importance of fibers for the regulation of digesta flow in the upper digestive tract [1, 10, 11]. Therefore, fibers are often added to the feed to improve gastrointestinal function and nutrient use [reviewed by 10, 11]. Although beneficial effects of fibers are generally ascribed to their physical structure, preliminary data [12, 13] suggest that also other physiochemical properties of fibers, such as fermentability and viscosity, are responsible for these effects. The effects of fibers on hindgut reflux were never studied, but previous studies illustrate that high fiber diets promote the separation of solid and liquid digesta and that the amount of fiber



directed to the ceca, seems to be influenced by fiber properties, as particle size and solubility [14, 15]. Hence, it can be hypothesized that reflux in the various sections of the digestive tract will depend on dietary fibers (levels and types). In addition, it may be expected that effects of fibers may depend on dietary protein levels, because reflux may be reinforced at low dietary protein supply [9]. Two experiments, testing various fibers at different protein levels will be performed to get insight in the influence of the diet on reflux and to separate the effects of physical structure from other physicochemical properties of fibers.

The project is characterized by its novel approaches to quantify digesta fluxes and the contribution of reflux to the bird's nutrient supply. Simultaneous oral and cloacal administration of non-absorbable tracers representing solid and liquid gut contents and CT-scanning techniques, will be used to quantify (reverse) digesta fluxes. N-recycling will be quantified with stable-isotope-labeled N-sources that are modelling undigested protein (eukaryotic protein) or metabolized protein (uric acid). Targeted transcriptome analyses of gut motility will be used to obtain more insight in the regulation of reflux.



**Figure 1.** Occurrence of reflux in individual birds will depend on their genetic potential and external factors, including nutrition.

**References**

1. Sacranie, A., Svihus, B., Denstadli, V., Moen, B., Iji, P.A., Choct, M. The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. 2012. *Poult Sci*: 91, 693-700.