



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is the overarching term used to describe the progressive loss of kidney function over time by any cause. CKD has many possible causes, of which hypertension and diabetes mellitus are the

most common. CKD represents a state of salt-sensitivity. Salt-sensitivity is defined as the blood pressure response to standardized manipulations of sodium balance. For example, Weinberger and colleagues defined salt-sensitivity as a decrease in blood pressure ≥ 10 mm Hg when switching individuals from sodium loading to sodium restriction (1). Salt-sensitive hypertension in CKD introduces a vicious cycle, because hypertension leads to further kidney damage and increases cardiovascular risk (**Figure 1**). It has been suggested that the degree of salt-sensitivity in patients with CKD increases with declining glomerular filtration rate (GFR) (2). Salt-sensitivity, however, remains poorly understood. Salt-sensitive hypertension in CKD is often resistant to pharmacological therapy. Therefore, a better understanding of the pathophysiology is crucial to improve treatment.

Both dietary sodium and potassium have an effect on blood pressure. High dietary sodium intake increases blood pressure in patients with CKD, whereas high dietary potassium intake has blood pressure-lowering effects (3). High dietary sodium and low dietary potassium also seem to have direct harmful effects on the kidneys, independent of blood pressure. There is accumulating evidence that high dietary potassium intake may exert so-called renoprotective effects (4). The pathophysiology of the underlying mechanisms is largely unknown.

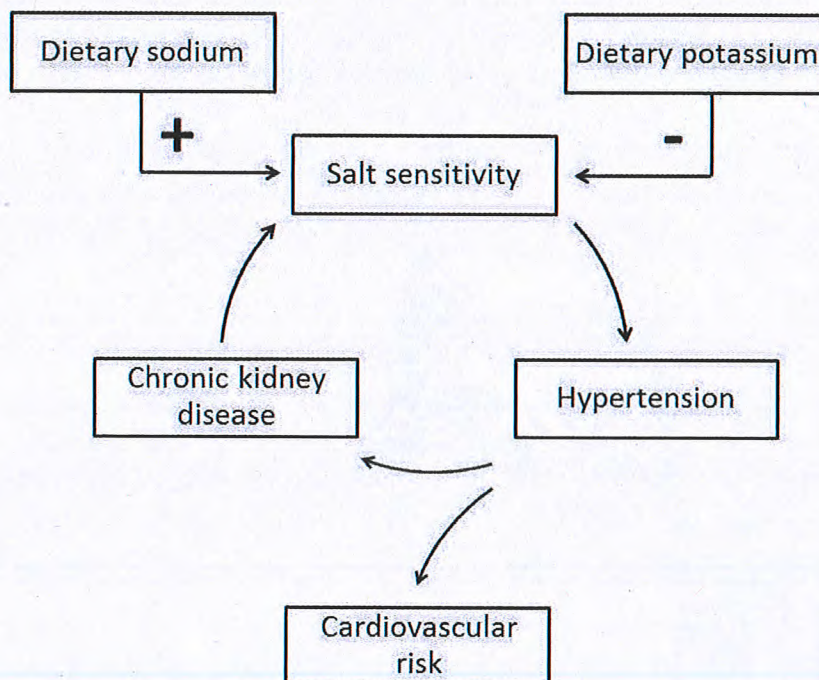


Figure 1. The vicious cycle of salt sensitivity in CKD.

Modeling of salt-sensitivity in CKD has indicated that one of the underlying mechanisms involves increased tubular sodium reabsorption (5). Fine-tuning of sodium reabsorption mainly takes place in the distal tubules of the kidneys and involves two sodium transporters, namely, the sodium chloride cotransporter (NCC) and the epithelial sodium channel (ENaC) (**Figure 2**). A study showed that after 5/6 nephrectomy in rats (a common animal model for CKD) sodium transporter density per nephron was increased in the distal tubules (6). It is unknown how this upregulation occurs.

The renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) is a major blood pressure regulatory system. In CKD the circulating RAAS and intrarenal renin-angiotensin-system (RAS) become dysregulated. Both circulating aldosterone and local (renal) angiotensin II are able to increase sodium uptake. Also, both dietary sodium and dietary potassium can influence the regulation of kidney sodium transporter activity. Other work showed that a high sodium diet can activate the mineralocorticoid receptor (MR) independent of aldosterone (7). MR activation subsequently leads to increased activity of NCC and ENaC. Recent work showed that low dietary potassium can increase distal sodium transporter activity and thereby blood pressure (8). This activation was mediated by changes in intracellular chloride concentrations. High potassium intake on the other hand is linked to lower blood pressure and decreased activity of NCC. This potentially beneficial effect, and its underlying mechanisms, however, have never been investigated in CKD.

Because both sodium and potassium are important regulators of sodium transporter activity in the kidney, and consequently blood pressure, we use a combined approach and will focus on the effects of dietary sodium and potassium. Our current knowledge of sodium transporter function in vivo is predominantly derived from normal (wild type) animals or hypertension models, but this issue has not yet been studied in CKD models.

Figure 2 shows an overview of the pathophysiology of salt sensitive hypertension in chronic kidney disease. (Abbreviations: NCC: Sodium chloride cotransporter; ENaC: Epithelial sodium channel.)

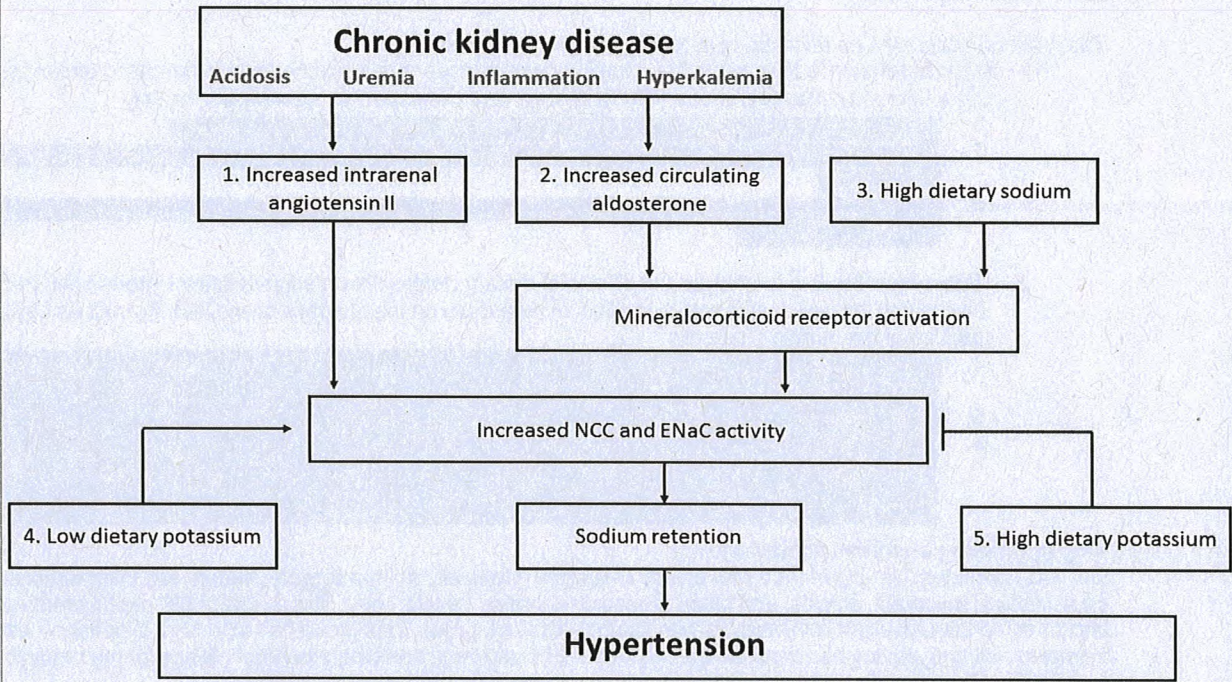


Figure 2. Number 1 to 5 relate to hypotheses 1 to 5.

Based on previous investigations we hypothesize that [redacted] in Figure 2):

- 1) Dysregulation of the [redacted]
- 2) Dysregulation of the circulating renin-angiotensin-aldosterone-system
- 3) Direct stimulation of the [redacted] by dietary sodium

These mechanisms can be blocked by pharmacological interventions (i.e. [redacted] blockers) and surgical interventions (i.e. adrenalectomy).

Additionally, we intend to study the effects of dietary potassium on blood pressure, renal sodium transporters and, specifically, its effect on kidney function (i.e., its renoprotective effects). To address this, we propose two additional hypotheses [redacted]

In the 5/6 nephrectomy model both angiotensin receptor blockers [redacted] renoprotective effects (9, 10). Therefore, we will compare a high dietary potassium diet with these two renoprotective drugs. This results in the final hypothesis:

- 6) [redacted]

In this project, we focus on dietary sodium and potassium. Although the effects of dietary sodium on blood pressure in CKD are known, the pathophysiology remains unclear. The concept that a diet high in potassium could be beneficial in patients with CKD is novel and the underlying pathophysiological mechanisms are unexplored. Therefore, we aim to investigate how both dietary sodium and potassium can activate renal sodium transporters in salt-sensitive hypertension in CKD.

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?

Main objective of the project: To investigate the effects of dietary sodium and potassium on kidney function in chronic kidney disease

The main objective can be subdivided in two separate sub-objectives:

1. **Sub-objective 1** is to analyze how renal sodium transporters are activated by increased dietary *sodium* intake in chronic kidney disease (CKD). We will test three specific hypotheses, namely
 1. 10.1 c en 10.2 g
 2. 10.1 c en 10.2 g
 3. 10.1 c en 10.2 g
2. **Sub-objective 2** is to analyze the effects of dietary *potassium* on salt-sensitive hypertension in CKD, and investigate the direct renoprotective effect of potassium on the progression of CKD. We will test three additional hypotheses, namely

4. 10.1 c en 10.2 g
5. 10.1 c en 10.2 g
6. 10.1 c en 10.2 g

Why are these objectives achievable?

Our lab has extensive experience with animal research, especially animal surgery, dietary salt interventions, metabolic cage studies, myograph studies, and blood pressure recording by telemetry. The model of 5/6 nephrectomy will be implemented through close collaboration with another research group. This group has extensive experience with this animal model and already has provided training to our PhD-students and laboratory-technicians for the required surgical procedures. Therefore, we expect implementation of this model in our lab will be realistic.

In the past 25 years, our 10.1 c en 10.2 g, 10.2 e. en g

[Redacted text]

approaches to hypertension and CKD in the next 5 years.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

By addressing our main objectives, we will offer more insight in the pathogenesis of salt sensitive hypertension in CKD. The study of sodium transport by the kidney and chronic kidney disease (CKD) have largely been two separate research fields. Our current knowledge of sodium transporter function *in vivo* is predominantly derived from normal animals or hypertension models, but this issue has not yet been studied in CKD models. Great progress has been made in unraveling the molecular physiology of the various sodium transporters, but it is unknown how CKD affects these transporters or the hormones regulating these transporters. This application therefore links the research areas of sodium transport and CKD by addressing the mechanisms of increased salt-sensitivity in CKD.

The insight that dietary potassium can regulate blood pressure *and* can have direct protective effects on kidney function is new to the scientific field of nephrology. This project, therefore, also links this research to the field of CKD. Lowering blood pressure by a low dietary sodium intervention has been a cornerstone in the treatment for CKD for many years. However, a high dietary potassium dietary intervention goes against the commonly advised low-potassium diet for CKD patients. Therefore, this new therapeutic approach has not been investigated. Given that hypertension in CKD-patients is often resistant to standard treatment we think that the results of this project will provide a rationale for, and a deeper understanding of, this new therapeutic approach for treatment of CKD.

This project focusses on the pathophysiology underlying salt-sensitivity, but outcomes will have several clinical implications. 10.2 e. en g

[Redacted text] This approach underlines the translational aspect of this application. Ultimately, this preclinical research should lead to a better understanding of human salt-sensitive hypertension and renal disease to benefit better disease management.

Social relevance

According to the 2010 Global Burden of Disease Study, chronic kidney disease (CKD) ranked 18th on the list of causes of total number of deaths worldwide in 2010. The prevalence is estimated to be 8-16%, with over 2 million people under renal replacement therapy to sustain life (this represents 10% of those who need it). In the US, treatment of chronic kidney disease is likely to exceed \$48 billion per year. The prevalence of CKD in the general Dutch population is roughly 8%. This means over 1 million people in the Netherlands have some degree of kidney damage. This high prevalence is directly related to the presence of hypertension and diabetes in over 30% of the general population, which are the two most common causes of CKD.

Apart from the numbers and the costs, CKD leads to a significant burden on patients from all ethnicities, sexes, and ages. CKD is associated with a high mortality, a low quality of life and an increased risk of comorbidity. CKD is a progressive disease that cannot be cured. Therefore, the focus of treatment lies on halting the processes that lead to further progression of disease. Salt-sensitive hypertension is an important contributor to this process. Understanding the mechanisms underlying salt sensitivity is crucial to find better and more effective treatment. Additionally, the mechanisms that lead to salt-sensitivity (e.g., increased kidney angiotensin II) may also contribute to kidney fibrosis. As such, unraveling the pathophysiology of salt-sensitivity in CKD may help prevent the progressive loss of kidney function that characterizes most forms of CKD. To bring the insights from basic research to the clinic, we focus on urine. We believe urinary parameters mirror disease processes of individual patients and will help to personalize therapy. Better treatment of salt-sensitivity will reduce the burden of disease and may reduce the dramatic cardiovascular morbidity and mortality associated with CKD. Most patients with CKD die because of the cardiovascular complications associated with kidney failure. By interrupting the vicious cycle of salt-sensitivity, hypertension and kidney damage CKD-related morbidity and mortality can be prevented.

There is a growing awareness regarding the relationship between dietary salt, blood pressure and cardiovascular outcomes. In the last few years the *New England Journal of Medicine* has published multiple articles on this relationship. Therefore, the statement seems justified that, after smoking and obesity, dietary salt will be the next public health focus. Patients with CKD are exquisitely salt-sensitive, which suggests that high dietary sodium intake is even more detrimental in this population. The same effect could be expected from a low dietary potassium intake. The objectives of this application can be reduced to a both simple and fundamental question: what causes the kidneys to retain more salt? It is necessary to answer this question before interventions can be successful.

3.4 Research strategy

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

In this project we will use the 5/6th nephrectomy model (also called subtotal nephrectomy model or remnant kidney model). The 5/6th nephrectomy model is the most common model for CKD, because it recapitulates the hallmarks of the later stages of CKD of any cause, including a low GFR, proteinuria, and salt-sensitive hypertension (11, 12). We will use a model that combines uninephrectomy with ablation of two thirds of the contralateral kidney.

The project is divided in two stages (see **Figure 3**). Stage 1 comprises our pilot experiments. Herein we will characterize and optimize the 5/6th nephrectomy model. Finalization of stage 1 will be an **essential milestone**. After this milestone is reached we will commence with stage 2. In stage 2 we will address our two main objectives. Stage 2 is dependent on results obtained in stage 1. Therefore, stage 2 will commence only after completion of stage 1. If experiments in stage 1 prove to be unsuccessful by parameters specified in paragraph 3.4.2, we will not proceed with stage 2. However, based on our previous experience with animal research, and our close collaboration with another experienced group we do not expect this will occur.

The experiments in stage 2 are performed parallel in time. Outcomes from these experiment are not dependent on each other.

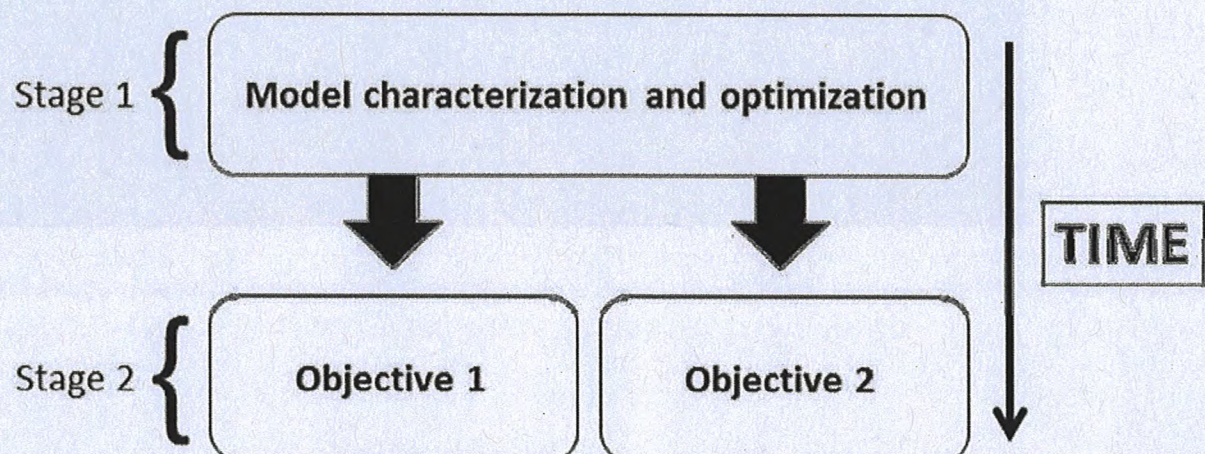


Figure 3. General design of the project. Stage 1: Model characterization and optimization Stage 2: Experiments of objective 1 and 2.

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.

Basic outline of the different components

10.1 c en 10.2 g

[Redacted text]

A.

10.1 c en 10.2 g

B.

C.

D.

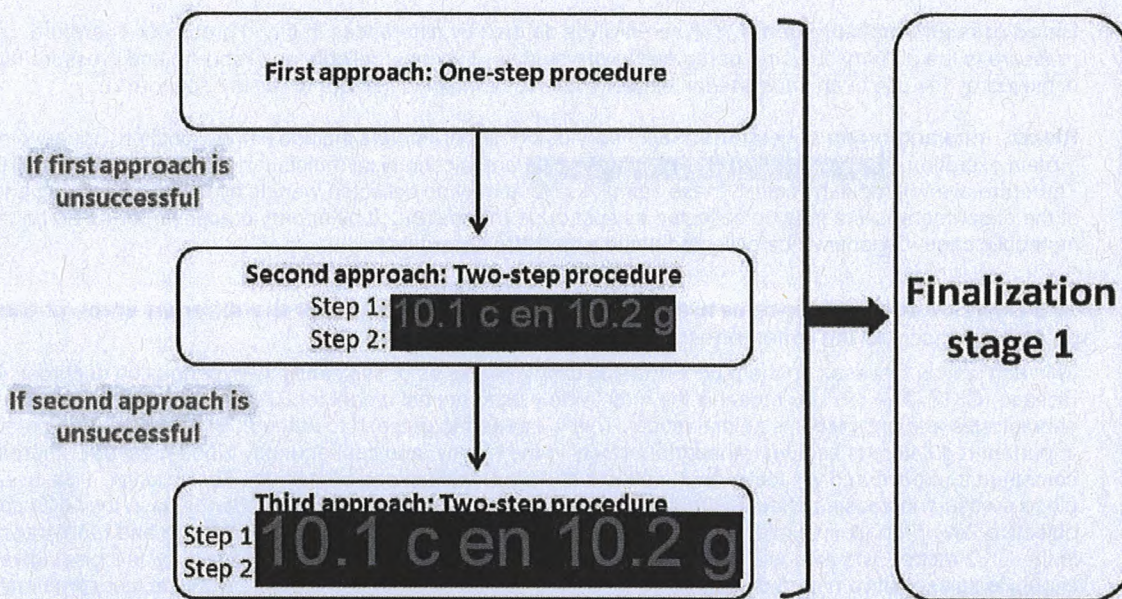


Figure 4. Three approaches for the surgical procedures.

- 1.
- 2.
- 3.

10.1 c en 10.2 g

In appendix 1, section A, all experimental procedures during the parts are described in more detail. The maximum amount of animal numbers for each part is specified in more detail in appendix 1, section B (animal numbers).

Stage 2.

- **Sub-objective 1. Test three hypotheses of the main objective**
We will analyze the responsible pathways leading to hypertension and kidney sodium transporter activation. [redacted]
- **Sub-objective 2. Studying the effects of dietary potassium on blood pressure and kidney sodium transporters**
We will analyze how different potassium diets affect blood pressure, renal sodium transporter activity and renal function. Rats will be put on low potassium, high potassium or first a low, and then a high potassium diet a [redacted]

Type of animal procedure that will be performed

Animal species: We will use Sprague Dawley rats all our experiments. This animal allows serial blood sampling, telemetric blood pressure measurements, and the possibility for the surgical procedures required to answer our research questions. Also, the 5/6th nephrectomy model for CKD is well characterized in this animal and the pharmacological agents we use are similarly well characterized in rat studies.

Surgical procedures: All animals [redacted]

Pharmacological interventions: Drugs are commonly and preferably administered using surgical placement of osmotic minipumps, but occasionally drugs need to be administered through the diet or drinking water, or by intramuscular, intraperitoneal, subcutaneous, or intravenous injections

Blood pressure measurements: Salt sensitivity is defined by differences in blood pressure. Therefore, blood pressure is the primary outcome parameter in our studies. The most reliable and robust blood pressure recordings are achieved by the use of an intra-arterial telemetry device (explained in more detail in appendix 1).

Blood, urine and organ collections: Secondary outcome parameters include kidney function, urinary electrolyte and protein excretion, 10.1 c en 10.2 g and biochemical/molecular parameters measured in tissue. Therefore, we will regularly collect these samples. Blood may be collected weekly by tail vein sampling and at the end of the experiment. Urine may be collected as spot urine (normalizing it by urinary creatinine) or as 24-hour urine in a metabolic cage. Organs will be collected at the end of the experiment.

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

This application focusses on the pathophysiological mechanisms of salt sensitive hypertension in chronic kidney disease (CKD). The 5/6th Nx model is the most widely used animal model for CKD. In stage 1 we propose to characterize and optimize this animal model. This is needed to proceed to stage 2. Both sodium and potassium are important regulators of sodium transporter activity in the kidney, and consequently blood pressure. Therefore, we use a combined approach and will focus on the effects of dietary sodium and potassium. For objective 1 we use the known blood pressure increasing effects of a high sodium diet to elicit the salt sensitive phenotype in the CKD-animals. In objective 2 we propose to explore how high and low potassium diets affect blood pressure and renal transporter activity in the CKD-model. The extension of the known 'sodium sensitivity' to 'potassium sensitivity' is logical, given the exquisite salt sensitive nature of CKD-patients with regard to sodium, and the previously described animal studies relating potassium diets to blood pressure changes and sodium transporter activity.

Our goal is to translate results from our animal studies to the clinic. Our research focusses on the effects of non-pharmacological, dietary interventions in CKD. Both dietary sodium and potassium can be adjusted with relative ease in daily meals. Dietary sodium restriction is already widely implemented and is, therefore, recommended to most patients with CKD.

In an ongoing clinical trial 10.1 c en 10.2 g studying the effects of low-sodium diets on renal sodium transporter activity and blood pressure in patients with CKD. Outcomes from experiments addressing objective 1 will provide essential information on the pathophysiological mechanisms driving sodium sensitivity in these patients. Outcomes from experiments addressing objective 2 will provide crucial pathophysiological background and rationale for a new clinical trial studying the potentially beneficial effects of a high-potassium diet on renal function and blood pressure in patients with CKD. As patients with CKD are often resistant to antihypertensive treatment, this novel and easy-to-implement treatment could offer new promising revenues.

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	Effects of dietary sodium and potassium on kidney function in chronic kidney disease
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD ^{10.2 .e. en g} 2016790
2. Titel van het project: Salt sensitive hypertension in chronic kidney disease.
3. Titel van de NTS: Effecten van natrium en kalium op de nierfunctie bij chronische nierschade.
4. Type aanvraag:
 - X nieuwe aanvraag projectvergunning
 - X wijziging van vergunning met nummer AVD ^{10.2 .e. en g} 2016790-1 (alle toegevoegde tekst is in groen in dit advies aangegeven)
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: ^{10.2 .e. en g}
 - telefoonnummer contactpersoon: ^{10.2 .e. en g}
 - e-mailadres contactpersoon: ^{10.2 .e. en g}
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - X ontvangen door DEC: 01-12-2016
 - X aanvraag compleet: 04-01-2017
 - X in vergadering besproken: 19-12-2016 en 11-01-2017
anderszins behandeld
termijnonderbreking(en) van / tot
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - X aanpassing aanvraag: 04-01-2017
 - X advies aan CCD: advies is op 23-01-2017 verstuurd naar aanvrager

Adviestraject wijziging vergunning:

- X ontvangen door DEC: 15-02-2019
- X aanvraag compleet: 08-03-2019
- X in vergadering besproken: 18-02-2019
anderszins behandeld
termijnonderbreking(en) van 22-02-2019 tot 08-03-2019
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen

14 juli 2016

- X aanpassing aanvraag: 08-03-2019
advies aan CCD: Het advies is aan de CCD en aanvrager
gestuurd op 11-03-2019

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen de instelling.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 27-12-2016
- Gestelde vragen:
 - o Nadere formulering van de hoofddoelstelling van het project.
 - o Nadere uitwerking van aspecten van het wetenschappelijk belang.
 - o Nadere beschrijving van de modelontwikkeling als (sub)doelstelling of milestone binnen dit project.
 - o Nadere beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren.
 - o Nadere beschrijving en onderbouwing van de go/no-go criteria.
 - o Nadere beschrijving c.q. onderbouwing van bepaalde aspecten van het experimental design.
 - o Nadere toelichting en onderbouwing van de toegepaste methode voor bloeddrukmetingen.
 - o Nadere toelichting en onderbouwing van het gebruik van mannelijke dieren.
 - o Correcte beschrijving van de verfijningsmaatregelen.
 - o Toespitsen en helder definiëren van de humane eindpunten.
 - o Nadere toelichting en onderbouwing van de inschatting van het ongerief voor de dieren.
 - o Redactionele aspecten: Nader verduidelijken danwel toespitsen van diverse tekstpassages. Helderheid van de tekst en het taalgebruik in de NTS.
- Datum antwoord: 04-01-2017
- Alle vragen/opmerkingen werden naar tevredenheid beantwoord en zijn verwerkt in de bijgestelde projectaanvraag.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- 9b. Correspondentie met de aanvrager met betrekking tot de wijziging:

- Datum: 22-02-2019
- Strekking van de vragen en opmerkingen
De vragen en opmerkingen hadden betrekking op de volgende punten:
 - o Doelstelling van de wijziging
 - o Positionering wijziging in oorspronkelijke project
 - o Beschrijving experiment
- Datum antwoord: 08-03-2018
- Alle vragen/opmerkingen werden naar tevredenheid beantwoord en zijn verwerkt in de bijgestelde wijzigingsaanvraag.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

De aanvraag betreft een wijziging van een reeds eerder vergund project.

3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De vertaling van de doelstellingen naar de experimenten is inzichtelijk en herleidbaar. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

De experimenten in de wijzigingsaanvraag richten zich op subdoelstelling 1 (fase 2) van het project. De nieuwe experimenten zijn gericht op het (beter) toetsen van hypothese 1. De interventie die tot nu toe is gebruikt om deze hypothese te toetsen is 10.1 c en 10.2 g

. Deze interventie leidde echter niet tot een volledige onderdrukking van het renine-angiotensine systeem. De wijziging betreft het testen van een alternatieve methode om het renine-angiotensine systeem wel volledig te onderdrukken. Op basis van eigen ervaringen in een ander diersysteem is het de verwachting dat met de combinatie van 10.1 c en 10.2 g

wel een volledige onderdrukking te krijgen (>99%). Deze is essentieel voor de vervolggroepen. Hoeveel het renine-angiotensine systeem kan worden onderdrukt in dit diersysteem voor chronische nierschade met hoge bloeddruk wordt onderzocht in 4 experimentele groepen: alleen het 10.1 c en 10.2 g gericht 10.1 c en 10.2 g, alleen een 10.1 c en 10.2 g, een combinatie van een 10.1 c en 10.2 g met een 10.1 c en 10.2 g, of geen behandeling.

2. Voor zover de DEC weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie/doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
De voorgestelde wijziging valt binnen de oorspronkelijke doelcategorie.

Belangen en waarden

4. Chronische nierschade komt voor bij ca. 10% van de Nederlandse bevolking en dit aantal neemt nog steeds toe. Chronische nierschade kan er toe leiden dat een patiënt door middel van nierdialyse behandeld moet worden of een niertransplantatie moet ondergaan. Hoge bloeddruk als gevolg van nierschade is vaak niet gevoelig voor standaard behandeling. Het is cruciaal om te voorkomen dat daardoor de bestaande nierschade verergert. Er zijn verschillende oorzaken voor nierschade. Steeds duidelijker wordt dat de hoeveelheid zout (verhouding natrium en kalium) in de voeding een belangrijke bijdrage levert aan nierschade. Natrium in de voeding kan zowel direct als indirect bijdragen aan het ontstaan van (zoutgevoelige) nierschade. Een tekort aan kalium versterkt de nadelige effecten van natrium en verhoogt de bloeddruk. Beschadigde nieren hebben de neiging meer zout vast te houden via gespecialiseerde zoutkanaaltjes in de nier. Tot nu toe is nog onduidelijk wat de rol van deze zoutkanaaltjes is tijdens het ontstaan van nierschade.
Het directe doel van het project is om meer inzicht te krijgen in de werking van zoutgevoelige hoge bloeddruk bij ratten met chronische nierschade. Dit zou aangrijpingspunten kunnen opleveren voor nieuwe behandelingswijzen voor de preventie c.q. behandeling van chronische nierschade. Het uiteindelijke doel is om de inzichten verkregen uit dit onderzoek te kunnen vertalen naar concrete dieetadviezen voor nierpatiënten.
Deze onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het te gebruiken rattenmodel, en met translationeel onderzoek op dit gebied. Het is aannemelijk dat positieve resultaten uit dit onderzoek op termijn zullen kunnen leiden tot toepassing in de kliniek.
De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een reële relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Bovendien is zij van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
Het belang van de doelstelling is niet gewijzigd ten opzichte van de oorspronkelijke aanvraag. De aanvrager heeft experimenten toegevoegd die moeten leiden tot een beter model, waarmee in de volgende fase van de effecten van hoog en laag Natrium zullen worden onderzocht. De toegevoegde experimenten sluiten aan bij het oorspronkelijke hoofddoel en de subdoelstellingen.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast doordat bij de dieren chronische nierschade wordt veroorzaakt. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Carrièremogelijkheden en status kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Er dient tenminste (ook) sprake te zijn van een algemeen of publiek belang, wil een dierproef

gerechtvaardigd zijn.

Voor de wetenschap is het belang dat de resultaten toegankelijk worden voor een zo groot mogelijk onderzoeksveld en gepubliceerd worden in high-rank tijdschriften en bijvoorbeeld uitgedragen worden op congressen.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan hun gezondheid en aan verbetering van hun kwaliteit van leven.

Mechanistisch inzicht in het ontstaan van zoutgevoelige nierschade kan bijdragen aan een gerichte behandeling en preventie van nierschade als gevolg van hoge bloeddruk. Dit kan leiden tot een betere kwaliteit van leven voor de patiënt. Het kunnen beschikken over adequate behandelingen voor invaliderende aandoeningen, zoals nierschade, is van groot belang voor de samenleving.

De toegevoegde experimenten sluiten naadloos aan bij de oorspronkelijk aangegeven belangen.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
Geen verandering door wijziging.
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn niet conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
Bij de dieren vindt continue meting van de bloeddruk plaats met behulp van telemetrische apparatuur. Bloeddruk met behulp van telemetrie is voor dit type experimenten de meest betrouwbare methode waardoor tevens minder dieren nodig zijn. Tevens is het voor de dieren de minst stressvolle methode (i.t.t. metingen via tail-cuff). Telemetrische metingen kunnen niet worden uitgevoerd bij dieren die in groepen zijn gehuisvest. Daarom is het noodzakelijk de dieren individueel te huisvesten. Bovendien worden de dieren 1x per week gedurende een bepaalde periode gehuisvest in metabole kooien, o.m. ten behoeve van het verzamelen van 24-uurs urine.
Geen verandering door wijziging.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de experimentele

procedures (met name ten behoeve van het aanbrengen van nierschade en de gevolgen daarvan) en als gevolg van de toegediende farmaca en/of diëten. Bij sommige (controle) dieren wordt geen nierschade veroorzaakt.

De DEC schat de ernst van het cumulatieve ongerief in als volgt: 'non recovery' voor 2% van de dieren, mild voor 11% en matig voor 87% van de dieren. Het cumulatieve ongerief voor de dieren is dus juist ingeschat conform de bovengenoemde percentages.

Het ongerief voor de 72 extra dieren in de wijziging valt binnen de kaders van de oorspronkelijke ongeriefinschattingen.

12. De integriteit van de meeste dieren wordt aangetast als gevolg van het aanbrengen van chronische nierschade. Bij een aantal dieren wordt geen nierschade aangebracht. Geen verandering door wijziging.

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 eerdere ervaringen met dit diermodel ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

Geen verandering door wijziging.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het ontstaan van chronische nierschade is een complex proces. Dit proces kan niet worden nagebootst in celkweek of met computermodellen. Hierdoor is het niet mogelijk het achterliggende werkingsmechanisme bij zoutgevoelige nierschade goed te onderzoeken zonder proefdiermodellen.

Geen verandering door wijziging.

15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzicht 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. Tevens wordt door de stapsgewijze aanpak door toepassing van go/no-go beslissingen onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De wijziging betreft het toevoegen van 1 experiment (Sub-objective 1: stage 2) Dit experiment is erop gericht om in [REDACTED] en een [REDACTED] 10.1 c en 10.2 g receptor blocker het renine-angiotensine systeem voor meer dan 99% te blokkeren. Naast de experimentele groep zijn er 4 controle groepen. De 72 extra dieren hiervoor zijn voldoende onderbouwd.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Het te gebruiken diermodel is een geaccepteerd en gevalideerd model voor dit type onderzoek, waar men veel ervaring mee heeft. Er zijn humane eindpunten vastgesteld om te voorkomen dat dieren onnodig met extra ongerief worden geconfronteerd.

De DEC is er van overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

14 juli 2016

Geen verandering door wijziging.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project uitsluitend gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager heeft de keuze hiervoor onderbouwd in de bijlage dierproeven. 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.

Geen verandering door wijziging.

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 de onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

Geen verandering door wijziging.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

Het wijzigingsverzoek is opgenomen in de NTS.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Voor 2% van de dieren wordt het ongerief ingeschat als non-recovery. Voor resp. 11% en 87% van de proefdieren vindt een milde dan wel matige aantasting van welzijn en integriteit plaats (bescheven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen er alles aan om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Bij zoutgevoelige nierschade en de gevolgen daarvan is sprake van een invaliderende aandoening die steeds vaker voorkomt. Er is nog geen afdoende behandeling die de aandoening kan genezen. De resultaten van dit project zullen kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor mensen met zoutgevoelige nierschade. De commissie vindt het beschikbaar komen van nieuwe therapieën voor mensen met deze aandoening van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het verkrijgen van meer inzicht in het mechanisme achter zoutgevoelige hoge bloeddruk bij ratten met chronische nierschade, teneinde deze uiteindelijk te kunnen vertalen naar nieuwe behandelingsstrategieën voor nierpatiënten.

Dit kan een verbetering van de gezondheid of de kwaliteit van leven voor deze mensen betekenen. 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 milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

Aan de eis dat het belang van de experimenten dient op te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend en de aantasting van hun integriteit, is door het gebruik van de aangevraagde extra dieren (het ongerief blijft ongewijzigd) nog steeds voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - X De DEC adviseert de wijzigingsvergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD 10.2 .e. en g 2016790-1

Datum 9 april 2019

Betreft Beslissing wijziging aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 15 februari 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of dietary sodium and potassium on kidney function in chronic kidney disease" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 2016790 waarvoor op 20 februari 2017 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 2016790-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u n=72 ratten toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Effects of dietary sodium and potassium on kidney function in chronic kidney disease" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie 10.2 .e. en g (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 11 maart 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de Inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toevoegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 20 februari 2017 een vergunning is verleend. Om onderstaande redenen zijn wij tot dit oordeel gekomen.



Vergunning

Aan de vergunning worden de volgende dierproeven toegevoegd:

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Effects of dietary sodium and potassium on kidney function in chronic kidney disease	ratten	72	2% terminaal 98% matig

Datum
9 april 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 2016790-1

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 gegevens in het colofon.

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

Drs. F. Braunstahl



2016611-1

Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

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?

3.3 Relevance

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

3.4 Research strategy

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

This development, optimization and applicability of MR methods can be divided in two stages. The *first stage* is the development and optimization of the techniques. To minimize the number of animals needed in this stage, the initial tests will be performed on phantoms whenever relevant. When these tests are successful, some may be directly applicable in studies of animal models or translated in a clinical application.

Most techniques will need further optimization in mice, rats or zebrafish, which will take place in the *second stage* of this project: evaluation/fine-tuning of MR methods in wild type animals who are subjected to imaging methods or undergo (MR-guided) interventions. In some cases, these experiments can also answer relevant research questions that don't need animal models of diseases. In other cases we evaluate whether the technique can be used to answer relevant research questions, whether it has value in a clinical setting, or if the techniques is safe or that complications/ side effects can be expected.

To clarify:

- The first phase is the development of a method or set-up. This method/set-up will first be evaluated in phantoms. Phantoms are filled with a material that resembles the (MR) properties of tissue as good as possible. Only when the results in phantoms are satisfactory, we will move to phase two. In phase two the method will be optimized in animals. For the transition to phase two as well the decision to continue with the development of the technique, we will evaluate the following criteria:

- Is the current or new set-up suitable to obtain the desired results?
- Are we obtaining the MR-signals that we expect and need to answer the research questions?
- Are the signal-to-noise-ratio, contrast, spectral/spatial/temporal resolution good enough to obtain useful information?

Only when the answer to all three questions is positive, we will continue with animal experiments. These animal experiments are necessary, because the extent to which a phantom resembles the properties of animal tissue is deficient. The experience we obtained during many research studies has taught us that the results in vivo are always different from phantom studies: the relaxation times are different and heterogeneous, there are physiological components like pulsing blood vessels, variable circulation, electrical conductivity, specific tissue composition and orientation, exchange of water between tissues and cellular components, movement due heart beat and breathing, etc.

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.

Development and optimization of new MR methods.

For the development and optimization of new methods, we will make use of wild type mice, rats or zebrafish. In most cases mice will be used, but some measurement setups will be dedicated to experiments with rats or zebrafish. The animals will be anesthetized, placed in the measurement setup, which will be moved into the MR-system. The animal will undergo MR imaging either to evaluate the quality of the set-up, to optimize an MR sequence or to optimize an (MR-guided) intervention technique. For the optimization of MR data acquisition sequences and interventions, a contrast agent might be administered and/or an intervention takes place.

Evaluation of the applicability of new MR methods.

Some of the MR methods developed will immediately be used in animal models or clinical applications. Other methods will first need more evaluation in healthy animals. To this end, we will evaluate the applicability of MR methods in wild type animals. The animal will be sedated, placed in the MR-system and undergo (contrast-enhanced) MR imaging and/or MR-guided interventions. The effects might be evaluated using histology or these studies might have a longitudinal character.

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.

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	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD103002016611-1/2016-0013
2. Titel van het project: Development, optimization and applicability of new MR methods
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling, optimalisatie en toepasbaarheid van nieuwe magnetische resonantie (MR) methodes
4. Type aanvraag:
 - Wijziging op een projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 26-09-2018
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-10-2018
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) 08-10-2018 tot 05-02-2019
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 05-02-2019
 - advies aan CCD: 14-02-2019
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 08-10-2018
 - Datum antwoorden: 05-02-2019
 - Gestelde vraag en antwoord:

-De aantallen te gebruiken zebravissen genoemd in de DAP en de NTS komen niet overeen. Ook komt de inschaling van het ongerief niet overeen. Dit dient met elkaar in overeenstemming te worden gebracht.

Antwoord: Wij hebben dit aangepast en het maximaal aantal te onderzoeken dieren staat in beide nu op 40. Het ongerief voor alle zebravissen is in beide documenten nu 100% terminaal ongerief.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een wijziging op een vergunning. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, gemarkeerd met *italics*, ingevoegd in de tekst van het oorspronkelijke advies hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop, optimize and evaluate the applicability of new MR methods'. De onderzoekers zullen nieuwe toepassingen van MR methoden ontwikkelen, bijvoorbeeld voor het toepassen van minimaal invasieve therapie op geleide van MR imaging en voor het met grote precisie volgen van kleine metaboliëten in het lichaam. Enerzijds is daarvoor aanpassing van de meetapparatuur nodig (zoals andere antennes) en anderzijds zullen meetmethoden aangepast moeten worden (zoals voor het gebruik van nieuwe biomarkers). Deze nieuwe toepassingen zullen gebruikt kunnen worden in wetenschappelijk onderzoek met proefdieren of proefpersonen, of in de kliniek. Moderne beeldvormende technieken zijn weinig belastend voor een organisme. De verkregen informatie kan gebruikt worden om meer inzicht in ziekteprocessen te krijgen, een diagnose te stellen, de voortgang van een ziekte te monitoren, het effect van een behandeling te meten, of een lokale interventie te begeleiden. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten op termijn kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere beeldvormende technieken gebaseerd op MR, wat zou resulteren in minder belastende gezondheidszorg voor veel mensen. De DEC acht deze ontwikkeling van substantieel belang. *Deze wijziging betreft het toevoegen van een extra diersoort, nl. de zebravis. Zebravissen zijn in toenemende mate een goed alternatief voor knaagdieronderzoek. De commissie vindt uitbreiding van onderzoek naar nieuwe MR methoden met zebravissen dan ook zeer relevant. De wijziging past binnen de doelstellingen van het project.*
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven, en beschikt over de benodigde zeer gespecialiseerde apparatuur. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare nieuwe beeldvormende methodes op basis van MR bij muizen of ratten of *zebravissen*. Gezien de historie van deze groep is het aannemelijk dat dit op relatief korte termijn tot toepassingen in de kliniek zal leiden.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het bijkomen uit de narcose na afloop van het imagen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde anesthesie, het i.v. inspuiten van contrastvloeistof tijdens het imagen, het met een operatie onderhuids aanbrengen van lichaamsvreemd materiaal, en het doden in als licht. Wanneer de dieren meer dan vijf maal onder anesthesie worden gebracht voor het imagen, dan veroorzaakt dit volgens de commissie matig ongerief. De dieren zullen voor het ontwikkelen en optimaliseren van MR metingen (bijlage

I) maximaal tweemaal per week, gedurende maximaal 26 weken, in totaal maximaal vijf maal onder narcose (maximaal twee uur) gebracht worden. Voor de fysiologische metingen (bijlage II) zullen de dieren maximaal 13 maal gedurende maximaal 26 weken gebruikt worden. Voor de ontwikkeling, optimalisatie en evaluatie van interventies tijdens MR-beeldvorming (bijlage III) zullen de dieren gedurende maximaal vijf uur onder narcose zijn. Hierna worden zij hetzij gedood, wordt het effect van de interventie geobserveerd (maximaal 6 weken), of wordt de interventie maximaal 10 maal herhaald gedurende maximaal 26 weken. Het ongerief voor de dieren die meerdere met pijn gepaard gaande interventies ondergaan schat de commissie in als matig. Het ongerief voor de dieren die éénmaal onder narcose gebracht worden en na afloop van het imageren worden gedood is terminaal. Het cumulatief ongerief voor de muizen en ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als terminaal voor 19% van de muizen en 23% van de ratten, licht voor 59% van de muizen en 59% van de ratten, en matig voor 22% van de muizen en 18% van de ratten. *De zebrevissen gaan onder narcose en worden gedood voordat zij ontwaken. Deze dierproeven zijn geclassificeerd als terminaal.*

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een nieuwe MR methode kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen. De onderdelen van het project die bestudeerd kunnen worden met behulp van fantomen, zullen zonder levende dieren worden uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk gebruik maken van surplus dieren. Gezien de aard van de experimenten gaat de DEC er van uit dat het geslacht van de dieren niet uitmaakt. De beschikbaarheid van hetzij mannelijke, hetzij vrouwelijke surplus dieren zou in de ogen van de commissie bepalend moeten zijn voor het geslacht van de te gebruiken dieren. Waar mogelijk zullen dieren meerdere keren gebruikt worden. Dit voorkomt het gebruik van meer proefdieren. De commissie acht dat aanvaardbaar, omdat het totale ongerief per dier daardoor niet wezenlijk toeneemt. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1017 muizen en 812 ratten *en 40 zebrevissen*.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is, en de onderzoekers zullen eventuele overige pijn bij de dieren zoveel mogelijk bestrijden door pijnstilling te geven. Toepassing van MR methoden draagt bij aan verfijning, omdat informatie wordt verzameld op een voor het dier weinig belastende manier. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden nieuwe en verbeterde toepassingen van MR beeldvorming ontwikkeld. Op termijn kunnen deze resultaten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe diagnostiek, betere evaluatie van een therapie, meer minimaal invasieve ingrepen op geleide van beeldvorming, of selectie van patiënten die baat zullen hebben bij een bepaalde therapie. Het belang van deze ontwikkelingen acht de DEC substantieel, gezien de brede inzetbaarheid van nieuwe MR methoden in de kliniek en het wetenschappelijk onderzoek. *Zebravissen zijn in toenemende mate een goed alternatief voor knaagdieronderzoek. De commissie vindt deze wijziging waarmee het onderzoek naar nieuwe MR methoden wordt uitgebreid met zebravissen dan ook zeer relevant. De wijziging past binnen de doelstellingen van het project.* Het is aannemelijk dat de resultaten uit dit onderzoek op korte termijn vertaald kunnen worden naar klinische toepassingen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat ongeveer één vijfde van alle dieren matig ongerief zullen ondervinden, drie vijfde van alle dieren licht ongerief zullen ondervinden, en één vijfde van alle dieren terminaal ongerief zal ondervinden als gevolg van het (herhaald) imagen onder anesthesie in combinatie met de benodigde handelingen. *Het ongerief voor de zebravissen blijft beperkt tot terminaal ongerief.* De commissie is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning voor de gevraagde wijziging te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. Prof. dr. H. Krieken
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016611-1

Datum 28 februari 2019

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte Prof. dr. Krieken,

Op 27 september 2018 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Development, optimization and applicability of new MR methods' met aanvraagnummer AVD103002016611, waarvoor op 1 september 2016 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD103002016611-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u een nieuwe diersoort toe te voegen aan bijlage dierproeven 3.4.4.1. van de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project 'Development, optimization and applicability of new MR methods' uit te voeren. De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (hierna: de DEC) RUDEC. Dit advies is ontvangen op 14 februari 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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 gegevens in het colofon.

Datum
28 februari 2019
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016611-1

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen

- Vergunning

Hiervan deel uitmakend: - DEC-advies



Datum
28 februari 2019
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016611-1

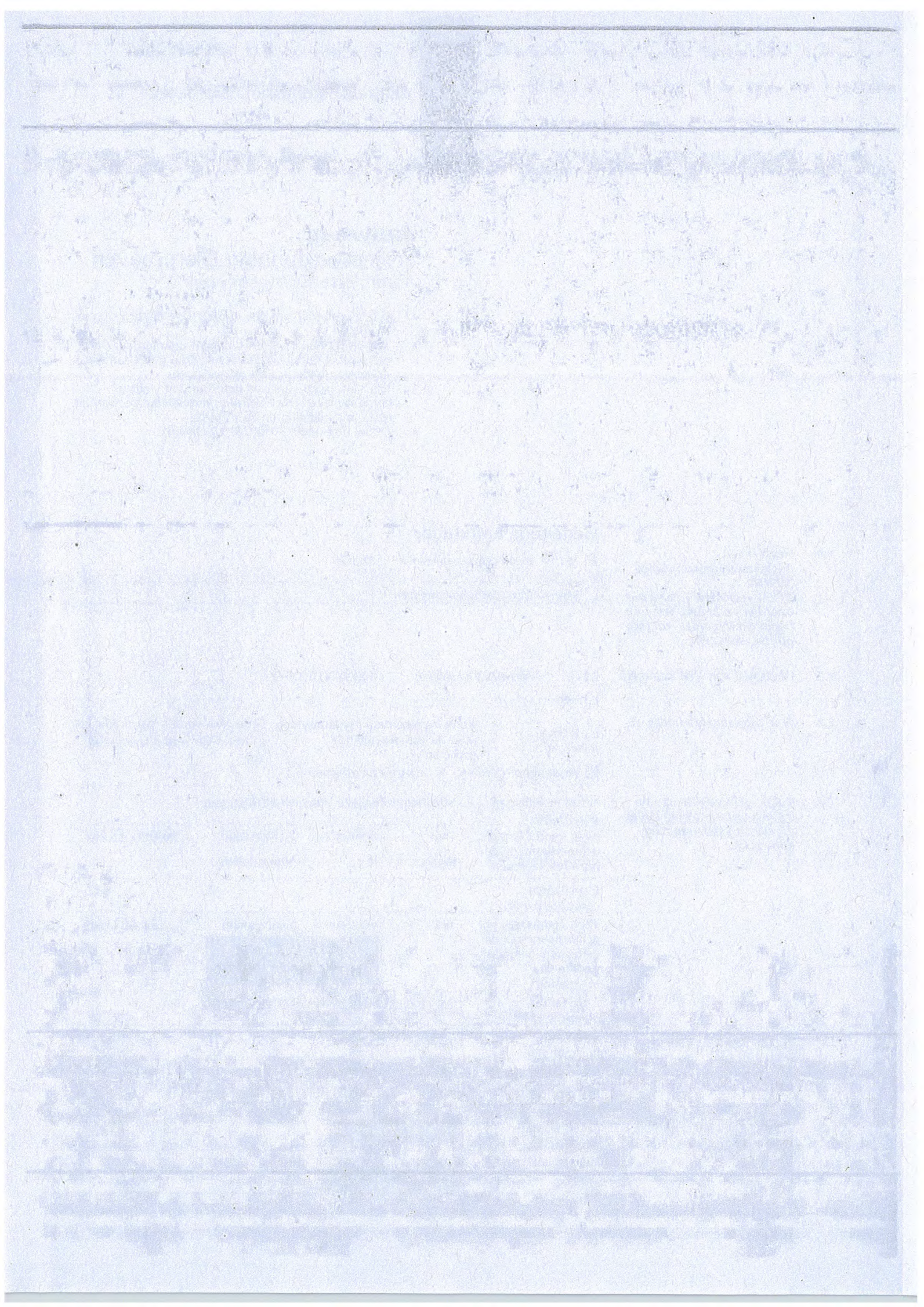
Gewijzigde Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Uw vergunning wijzigt als volgt:
(Wijzigingen zijn cursief weergegeven)

Naam proef	Diersoorten	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Development and optimization of (contrast enhanced) MR measurement acquisition sequences and examination procedures			
	Muizen	67	Terminaal 10%, Licht 90%
	Ratten	27	Terminaal 10%, Licht 90%
	<i>Zebravis</i>	<i>40</i>	<i>Terminaal</i>

Voor het overige blijft uw vergunning ongewijzigd.





Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10300
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Heeft u al een AVD nummer?	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw AVD nummer in	103002016627-3
		<input type="checkbox"/> Nee	
1.3	Wat voor aanvraag doet u?	<input type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag	Komt de aanvraag in aanmerking voor de vereenvoudigde procedure?
		<input checked="" type="checkbox"/> Wijziging of melding	> Ga verder met vraag 2.1
1.4	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel: Prof. dr. Voorletters: H. Achternaam: Van Krieken <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel: Voorletters: Achternaam: <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 29 / HP 231
		Postcode en plaats	6525 EZ Nijmegen
		Postbus, postcode en plaats	9101 6500 HB Nijmegen
1.5	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2 .e. en g <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	arts
		Afdeling	10.2 .e. en g

	Telefoonnummer	10.2 .e. en g
	E-mailadres	10.2 .e. en g
1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.8 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	10.2 .e. en g
	E-mailadres	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
1.9 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
	<input type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 2.2
	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze wijziging inhoudt en onderbouw deze. Antwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
2.2 Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6
<p>Er zijn tot nu toe 3 varkens in experiment gegaan. In verband met het uitvallen van 2 varkens (humaan eindpunt), zonder dat het chirurgisch handelen daar direct oorzaak voor is, willen we graag een verzoek doen om 4 extra dieren aan te vragen. In overleg met de lokale bio-statisticus is eerder de powerberekening gemaakt, waaruit blijkt dat we 10 proefdieren nodig hebben om een statische berekening te kunnen maken van onze bevindingen. Op dit moment hebben we 10 dieren aangevraagd met een ingecalculerde marge van 2 extra dieren in het geval van vroegtijdig uitval door chirurgische-, technische- of andere onvoorziene oorzaken (totaal 12 dieren op DAP 6). Door het vroegtijdig uitvallen van reeds 2 dieren vrezen we dat we uiteindelijk te weinig dieren hebben om een goede statistische berekening te maken. In acht neming van de situaties die zich hebben voorgedaan in dier 1 en 3, en de goede resultaten van dier 2 is het onderzoeksteam van mening dat we door gepaste maatregelen te nemen het onderzoek tot een goed einde kunnen brengen. Echter zal het goed zijn om eventueel extra dieren achter de hand te houden in het geval van het optreden van technische en/of andere onvoorziene oorzaken. Uiteraard zal er geen gebruik worden gemaakt van de dieren indien de overige experimenten naar behoren lopen.</p>	

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	31 - 08 - 2016
		Einddatum (t/m)	18 - 08 - 2021
3.2	Wat is de titel van het project?	Het toepassen van een mini hart-longmachine op de transplantatie van spierweefsel en ledematen.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Onderzoeken van het gebruik van een mini hart-longmachine voor transplantatie van spier en ledematen.	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	RU DEC
		Postadres	Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (HP 231)
		E-mailadres	dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

4 Factuurgegevens

4.1	(optioneel) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam: RadboudUMC / Dhr. 10.2.e.eng	Afdeling: 10.2.e.eng	
		Straat: Geert Groteplein		Huisnummer: 29 / HP231
		Postcode: 6525 EZ	Plaats: Nijmegen	
		Postbus: 9101	Postcode: 6500 HB	Plaats: Nijmegen
		E-mail: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl		
4.2	(optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer: Kostenplaats: 040823-461220, CDL projectnummer: 2016-0043		

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
		<input type="checkbox"/> Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1 <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing
		<input type="checkbox"/> Melding Machtiging <input type="checkbox"/>

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.9). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	10.2.e.eng
Functie	IvD
Plaats	Nijmegen
Datum	10 - 07 - 2020

Handtekening

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD103002016627-3 / 2016-0043
2. Titel van het project: Het toepassen van een mini hart-longmachine op de transplantatie van spierweefsel en ledematen
3. Titel van de NTS: Onderzoeken van het gebruik van een mini hart-longmachine voor transplantatie van spier en ledematen
4. Type aanvraag:

wijziging van vergunning met nummer AVD103002016627

5. Contactgegevens DEC:

- Naam DEC: RUDEC
- Telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
- Mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

6. Adviestraject:

- ontvangen door DEC: 10-07-2020
- aanvraag compleet
- in vergadering besproken: 14-07-2020 en 11-08-2020
- anderszins behandeld
- termijnonderbreking(en) van 20-07-2020 tot 05-08-2020
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
- aanpassing aanvraag: 05-08-2020
- advies aan CCD: 07-09-2020

7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

8. Correspondentie met de aanvrager:

- Datum: 20-07-2020
- Strekking van de vragen en antwoorden:

- De commissie is van mening dat de aanvraag wat prematuur is, aangezien u al rekening had gehouden met uitval van twee dieren. De nog resterende dieren zijn voldoende om uw onderzoeksdoel te bereiken, tenzij u te maken krijgt met nog meer uitval van dieren. Enerzijds beschrijft u dat u van mening bent dat u door de voorgestelde maatregelen het onderzoek tot een goed einde kunt brengen, maar anderzijds bent u daar kennelijk niet van overtuigd en wilt u nu niet twee, maar direct al vier extra dieren achter de hand hebben. U houdt er kennelijk rekening mee dat in het resterende deel van het onderzoek nog bijna de helft van de dieren kan uitvallen.

Antwoord: De onderzoeksgroep beaamt dat de aanvraag aan de vroege kant is, maar wil de continuïteit van het onderzoek waarborgen. Op dit moment zijn 3 experimenten vroegtijdig onderbroken, waardoor het resterende aantal dieren onvoldoende is om het onderzoeksdoel te bereiken. Zoals eerder aangegeven is experiment 1 vroegtijdig onderbroken door post-operatieve pulmonale klachten. Experiment 3 en 4 zijn vroegtijdig (post-operatieve dag 3)

onderbroken in verband met onvermogen op de achterpoot te staan.

Bij experiment 3 werd gedacht aan een neuropraxie, mede door het liggen op de achterpoot in de 1e nacht na de operatieve ingreep. Hierop is besloten om een extra medewerker in te zetten om de komende dieren te helpen met wisselgelingen gedurende deze eerste nacht. Bij experiment 4 werd eveneens een verminderde functie gezien van de achterpoot, ondanks dat er wisselgelingen waren uitgevoerd in de post-operatieve fase. Echter denken we dat er bij het plaatsen van de arteriële pre-operatieve schade is berokkend aan de n. ischiadicus waardoor de poot moeilijk te belasten was in de post-operatieve fase.

In navolging hierop hebben we een anesthesist uit het Radboudumc gevraagd ons te helpen bij het plaatsen van een arteriële middels het percutaan aanprikken van een arterie in de poot (minder invasief). Dit heeft er toe geleid dat experiment 5 en 6 voor de volledige duur opgevolgd zijn. De dieren konden op post-operatieve dag 1 al zelfstandig staan en vanaf dag 2 weer mobiliseren.

In retrospect hebben de goede resultaten van experiment 2 ons op het verkeerde been gezet, waardoor we niet eerder een verandering hebben aangebracht in de techniek van het aanprikken van de arteriële. We zijn dan ook van mening dat met de huidige aangebrachte veranderingen het onderzoek tot een goed einde gebracht kan worden. Een aanvulling van 2 dieren lijkt ons dan ook voldoende, in plaats van de eerder aangegeven 4 extra benodigde dieren. Zodoende worden er niet meer dieren aangevraagd dan we nodig zullen hebben om het onderzoeksdoel te bereiken.

-De commissie is verbaasd over de manier waarop de dieren zijn uitgevallen. Is er wel voldoende ervaring met het laten bijkomen van varkens na langdurige anesthesie? Is dit project wat dat betreft wel voldoende ingebed?

Antwoord: Over de jaren is er veel ervaring opgedaan op anesthesiologisch vlak van grote dieren. Uit eigen ervaring van ons dieren laboratorium, en gesprekken met andere onderzoeksgroepen (UMCU, Harvard Medical School), blijkt dat er vaak problemen zijn op pulmonaal gebied bij varkens. Het vullen van het dier per-operatief komt dus erg nauw. In samenwerking met de lokale dierenarts, UMCU en Harvard Medical School hebben we ons anesthesieprotocol geüpdate. Na het eerste varken zijn er geen andere uitvallers geweest door pulmonale afwijkingen.

Het prikken van een arteriële is een belangrijke en noodzakelijke handeling zodat continue parameters (bloeddruk/hartslag) afgelezen kunnen worden. Tot voor kort werd hierbij standaard een open techniek gebruikt, waarbij het betreffende vat vrijgeprepareerd werd. Deze techniek wordt op andere grote dieren en in de andere klinieken eveneens toegepast, zonder dat de dieren daarbij klachten ontwikkelen van hun achterpoot. Door de positieve resultaten van eerdere onderzoeken op grote dieren en experiment 2 zijn we op het verkeerde been gezet, waardoor gedacht werd dat deze open techniek veilig genoeg was om een arteriële te prikken. Helaas hebben experiment 3 en 4 getoond dat deze techniek mogelijk teveel schade veroorzaakt, waardoor de dieren in de post-operatieve fase klachten ontwikkelen van de betreffende poot (onvermogen tot belasten).

Door middel van het inschakelen van een anesthesist uit het Radboudumc hebben we een verbetering aangebracht in het aanbrengen van de arteriële. Middels een percutane techniek en een langere cannule, kan op een veilige manier een zijtak van de grote arterie aanprikkt worden. Dit is een minder invasieve techniek, waarbij de a. femoralis en n. ischiadicus ongemoeid blijven. Uit experiment 5 en 6 blijkt dat de varkens hiermee totaal geen problemen hebben met mobiliseren en belasten van de betreffende achterpoot. We zullen deze techniek

dan ook opnemen in ons huidige anesthesieprotocol en toepassen op de komende experimenten.

-De post-operatieve zorg voor de dieren blijkt niet optimaal te zijn. U stelt intensivering van die zorg voor in het aanvraagformulier, maar hiervan is niets vermeld in de gewijzigde DAP. De commissie is van mening dat gedurende de eerste 24 uur na de operatie de dieren continu gemonitord zouden moeten worden, en dat er twee personen beschikbaar zouden moeten zijn om het dier te helpen waar nodig. Zij verzoekt u in de DAP aan te geven hoe u de dieren post-operatief zult bewaken en verzorgen.

Antwoord: De onderzoeksgroep is het eens met uw voorstel. Op dit moment wordt bovengenoemde reeds toegepast.

Gedurende de eerste 24 uur na de operatie is er continu een biotechnicus aanwezig om het dier te monitoren, te voorzien van voedsel en vochttoediening. De lokale dierenarts is eveneens beschikbaar om het dier te helpen waar nodig. Direct post-operatief wordt het dier in de stal gelegd. De eerste 6 uur wordt het welzijn van het dier ieder uur gemonitord, hierbij wordt gelet op de ademhaling, temperatuur, pijnsensatie en alertheid (openen van ogen, reageren op aanwezigheid van andere varken of mens). Er wordt voeding (speciale voeding ter aansterken post-operatief, op advies van de lokale dierenarts) en vocht (middels spuit) aangeboden. Gedurende de nacht wordt het dier à 4 uur gecontroleerd. Het infuus (in oor) wordt de eerste 24 uur aangehouden, zodat (indien nodig) nog extra vocht toegediend kan worden.

Op post-operatieve dag 1 wordt het dier 3-4x/dag in de benen geholpen, hierbij wordt gelet op regelmatige spontane mictie/defecatie en intake van voeding/vocht. Bovendien wordt het looppatroon van het dier gemonitord.

Vanaf post-operatieve dag 2 is de verwachting (op basis van ervaringen uit experiment 2, 5 en 6) dat het dier zelfstandig in de benen kan komen, zelfstandig intake kan verzorgen. In het algemeen wordt gebruik gemaakt van een welzijnsdocument en wordt pijnstilling protocollair op vaste tijdstippen toegediend.

Bovengenoemde is reeds verwerkt en terug te lezen in de DAP.

-De dieren hebben kennelijk moeite met het ontwaken na de zeer langdurige anesthesie. Zijn er andere mogelijkheden denkbaar voor het ondersteunen van een varken dat bijkomt uit langdurige anesthesie die minder stressvol zijn voor het dier, bijvoorbeeld een hangmat?

Antwoord: De langdurige anesthesie heeft als gevolg dat de dieren behoorlijk suf en vermoeid zijn. Dit zien we ook bij de patiënten in de kliniek en wordt als normaal beschouwd. Echter is de onderzoeksgroep van mening dat het onvermogen om op de benen te staan niet te danken is aan de anesthesie, maar de eerder beschreven open techniek van het aanprikken van de arteriële lijn. Doordat deze techniek reeds is aangepast, wordt een directe verbetering gezien in het mobiliseren in de post-operatieve fase. Het structureel incorporeren van een hangmat zou enkel nodig zijn als het onvermogen tot mobiliseren blijft bestaan. Door een minder invasieve techniek voor het aanbrengen van de arteriële lijn én intensivering van de zorg voor het dier in de eerste 24 uur post-operatief zien we dat de dieren sneller in de benen komen en zelfstandig mobiliseren in de stal. Deze aanpassingen zijn in onze ogen voldoende om met zo min mogelijk interfereren toch de volledige 7 dagen de dieren te kunnen opvolgen. Het standaard incorporeren van een hangmat zou zeer waarschijnlijk meer stress opleveren voor het dier op.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een wijziging van vergunning met nummer AVD103002016627. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, in blauwe tekst, ingevoegd in de tekst van het oorspronkelijke advies hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk het onderzoeken van het gebruik van de mini hart-longmachine voor transplantatie van vrije lappen en ledematen en voor trombolysie behandeling van getromboseerde lappen. Dit onderzoek zal duidelijk maken hoe lang vrije spierlappen en ledematen met behulp van de mini hart-longmachine en geoxygeneerde conserverende vloeistof bewaard kunnen worden, en of deze vervolgens succesvol kunnen worden getransplanteerd in varkens. Voorts wordt duidelijk of bloedstolsels in vrije lappen met behulp van dit apparaat beter te behandelen zijn en of deze vrije lappen vervolgens succesvol getransplanteerd kunnen worden in varkens. De onderzochte toepassing van de mini hart-longmachine betreft een relevant klinisch probleem. Ischemische omstandigheden leiden na ongeveer vier uur tot onherstelbare schade aan met name spierweefsel, waardoor dit weefsel niet meer herstelt wanneer het weer van zuurstof wordt voorzien. Soms is het door omstandigheden niet mogelijk om bijvoorbeeld losgeraakte ledematen of andere grote stukken weefsel binnen deze tijdslimiet weer op de bloedvoorziening aan te sluiten. Wanneer een nieuwe methode gevonden wordt om deze weefsels langer buiten het lichaam te bewaren zullen minder ledematen en dergelijke verloren gaan vanwege ischemie-schade. Gezien de overeenkomsten op het gebied van anatomie tussen varkens en mensen is het aannemelijk dat de uitkomsten van het onderzoek eenvoudig toe te passen zijn bij mensen. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat deze resultaten op termijn kunnen leiden tot meer succesvolle weefseltransplantaties, en kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van geïsoleerde lokale behandeling van bijvoorbeeld ledematen met medicijnen zonder systemische bijwerkingen. De DEC acht deze ontwikkelingen van substantieel belang.
De tot nu toe behaalde resultaten zijn veelbelovend, maar nog niet afdoende om de resultaten op langere termijn na replantatie te kunnen voorspellen. De voorgestelde wijziging betreft (na aanpassing van de wijzigingsaanvraag door de onderzoeker) het toevoegen van twee DAPs waarin spierlappen of voorpoten na een periode van perfusie buiten het lichaam (18 tot 24 uur,

afhankelijk van het uitblijven van belangrijke ischemie-reperfusieschade) weer worden teruggezet (replantatie) in/aan het varken, waarna het varken zal ontwaken uit de anesthesie en gedurende 7 dagen wordt vervolgd. In die periode zal de vitaliteit (en bij de poot ook de functie) van het gereplanteerde weefsel meerdere malen worden geanalyseerd. Deze experimenten zullen duidelijk maken of het 18-24 uur buiten het lichaam bewaarde weefsel inderdaad veilig kan worden teruggezet met behoud van functie, en welke toevoegingen aan de perfusievloeistof daarvoor nodig zijn. Hiervoor worden 36 extra dieren aangevraagd. De commissie heeft uitgebreid van gedachten gewisseld met de aanvrager over nut en noodzaak van het zogenaamde pootmodel, omdat de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden wanneer zij ontwaken uit de narcose. De onderzoekers hebben duidelijk gemaakt dat het in het veld van preklinisch transplantatie onderzoek veel gebruikte varkenspoot model belangrijke informatie oplevert, met name over het optreden van het compartimentsyndroom en daarmee ook aanvullende informatie geeft over het behoud van de functie van de poot, die niet behaald kan worden met transplantatie van de spierlappen. De commissie is na een uitvoerige toelichting van de onderzoeker en bijstelling van de aanvraag uiteindelijk van mening dat de nu voorgestelde experimenten een zinvolle aanvulling zijn op het oorspronkelijke project, en bijdragen aan het behalen van de oorspronkelijke doelstelling van de projectaanvraag.

Het laten bijkomen van varkens na langdurige anesthesie bleek problematischer dan gedacht. Bij één varken werden pulmonale klachten geconstateerd na de operatie, waardoor het dier voortijdig uit het experiment is gehaald en gedood. Bij twee andere varkens heeft de gebruikte methode voor het plaatsen van een arteriële lijn tijdens de operatie naar alle waarschijnlijkheid geleid tot schade aan de n. Ischiadicus, met als gevolg een verminderde functie van de achterpoot. Die verminderde functie was reden om het experiment vroegtijdig af te breken bij twee dieren. Na consultatie van een anesthesist en aanpassing van de methode voor het plaatsen van een arteriële lijn (percutaan in plaats van met een open techniek) zijn twee varkens succesvol geopereerd, waarbij geen postoperatieve complicaties zijn opgetreden. Beide varkens zijn voor de volledige duur opgevolgd. De commissie is het eens met de onderzoeker dat dit deel van het onderzoek met de huidige aangebrachte veranderingen waarschijnlijk tot een goed einde gebracht kan worden. Met dit wijzigingsverzoek worden extra varkens gevraagd ter compensatie van de uitgevallen dieren.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. Het voorgenomen onderzoek bij varkens leidt tot betrouwbare uitspraken over de maximale bewaartijd van te transplanteren weefsel bij gebruik van de mini hart-longmachine en geoxygeneerde conserverende vloeistof, en het oplossen van bloedstolsels in deze weefsels met behulp van dit apparaat.

De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het onder narcose brengen van de dieren. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde toediening van premedicatie in als licht. Het ongerief als gevolg van de anesthesie, de handelingen en het doden tijdens anesthesie is

terminaal. Het cumulatief ongerief voor de varkens in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor alle dieren.

Het ongerief voor de 36 extra dieren in de toegevoegde experimenten is matig (voor 12 dieren) of ernstig (voor maximaal 24 dieren), omdat zij na replantatie weer bijkomen uit de narcose en gedurende 7 dagen in leven blijven om de vitaliteit (en bij het pootmodel ook de functie) te kunnen testen. De poot wordt in niet-anatomische positie teruggeplaatst, zodat het dier op drie poten zal moeten staan. In het kader van ander onderzoek hebben vergelijkbare experimenten elders plaatsgevonden. De dieren bleken in staat om 3,5 tot 12,5 uur na de operatie weer zelfstandig op drie poten te staan. De commissie is het eens met de inschatting van de onderzoekers dat het cumulatief ongerief voor de dieren matig is wanneer er vrije spierlappen worden gereplanteerd (12 dieren) en ernstig wanneer de voorpoot in een niet-anatomische positie wordt gereplanteerd (maximaal 24 dieren, afhankelijk van de berekening van de groepsgrootte op basis van de eerder behaalde resultaten). Het ongerief voor de twee extra dieren wordt ingeschat als matig, omdat zij na replantatie van de spierlappen weer bijkomen uit de narcose en gedurende 7 dagen in leven blijven om de vitaliteit van het weefsel te kunnen testen. De commissie is het eens met deze inschatting.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Het transplanteren van vrije lappen of ledematen die langere tijd buiten het lichaam zijn bewaard kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen. Het varken is in dit geval een goed model voor de humane situatie. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten en door het onderzoeken van twee spierlappen per varken wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 80 varkens.

Middels dit wijzigingsverzoek worden 36 varkens toegevoegd aan het onderzoek. De commissie is het eens met de onderzoekers dat deze experimenten met langere follow-up na replantatie noodzakelijk zijn om te evalueren of de weefsels veilig gereplanteerd kunnen worden met behoud van vitaliteit en functie op de langere termijn (7 dagen). De onderzoekers zullen de experimenten met het belastender pootmodel alleen uitvoeren indien de resultaten met de vrije spierlappen zeer veelbelovend zijn (in de aangepaste wijzigingsaanvraag is daartoe een expliciete go/no go toegevoegd). De aanvrager biedt aan om bij dit go/no go moment opnieuw advies te vragen aan de DEC. Die meent echter dat het de taak van de IvD is om in overleg met de onderzoeker te bepalen of de resultaten voldoende aanleiding geven om het onderzoek voort te zetten. Middels dit wijzigingsverzoek worden twee varkens toegevoegd aan het onderzoek ter compensatie van varkens die vroegtijdig uit het experiment zijn gehaald wegens het bereiken van een humaan eindpunt. Inmiddels is achterhaald waardoor de post-operatieve complicaties zijn opgetreden en is het operatieprotocol en het protocol voor verzorging direct na de operatie aangepast. Daarna zijn twee dieren succesvol geopereerd en voor de volledige duur opgevolgd. Na vragen van de commissie is het aantal gevraagde extra dieren van vier naar twee teruggebracht, omdat de onderzoekers erop vertrouwen dat de kans dat er nog meer dieren zullen uitvallen