

**Datum**

12 augustus 2019

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD107002016721-2

**Overwegingen**

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe te voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 10 januari 2017 een vergunning is verleend. De DEC heeft ons een voorwaarde ter overweging meegegeven. De voorgestelde voorwaarde betrof het volgende: Wanneer zes dieren bruikbaar blijken voor inclusie, worden de eventuele overige dieren niet meer aangewend. Omdat deze voorwaarde impliciet al uit de wet volgt (artikel 10 lid 2, sub a) hebben wij deze voorwaarde niet overgenomen. Wij willen u wel graag extra attent maken op artikel 10 lid 2, sub a van de wet. In dit artikel staat beschreven dat het verboden is een dierproef te doen met meer dieren dan nodig om de doelstelling te bereiken. Om die reden mogen geen dieren meer worden aangewend wanneer zes dieren bruikbaar zijn gebleken voor inclusie in de analyses.

**Vergunning**

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Ex vivo normothermic kidney perfusion in a porcine autotransplantation model	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	<i>14 24</i>	100% ernstig

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](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum**  
12 augustus 2019

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD107002016721-2

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Drs. F. Braunstahl

10.2 .e. en g

**Bijlagen**

- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



## Weergave wet- en regelgeving

### Artikel 1d

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

### Artikel 10

- 1 Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel
  - a. dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is;
  - b. dat kan worden bereikt met behulp van een andere methode of beproevingsstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt en die in de wetgeving van de Europese Unie is erkend;
  - c. waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- 2 Ingeval er verschillende mogelijkheden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt de dierproef geselecteerd die in de hoogste mate aan de volgende voorwaarden voldoet en naar verwachting bevredigende resultaten oplevert:
  - a. er wordt een zo gering mogelijk aantal dieren gebruikt;

26 MRT 2019

2017862-1

CCD  
Postbus 9 3118  
2509 AC DEN HAAG



# Centrale Commissie Dierproeven

w-862-1

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

<p>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></p>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <span style="background-color: black; color: white; padding: 2px;">10.2.e.eng</span> <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<table border="1"> <tr><td data-bbox="526 1097 782 1153">Naam instelling of organisatie</td><td rowspan="6" style="background-color: black; color: white; text-align: center; vertical-align: middle; font-size: 2em;">10.2.e.eng</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1153 782 1232">Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1232 782 1265">KvK-nummer</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1265 782 1310">Straat en huisnummer</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1310 782 1355">Postbus</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1355 782 1422">Postcode en plaats</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1422 782 1489">IBAN</td><td></td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	10.2.e.eng	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	KvK-nummer	Straat en huisnummer	Postbus	Postcode en plaats	IBAN							
Naam instelling of organisatie	10.2.e.eng															
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																
KvK-nummer																
Straat en huisnummer																
Postbus																
Postcode en plaats																
IBAN																
<p>1.3 Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i></p>	<table border="1"> <tr><td data-bbox="526 1422 782 1489">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td></td></tr> </table>	Tenaamstelling van het rekeningnummer														
Tenaamstelling van het rekeningnummer																
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="526 1489 782 1545">(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black; color: white; text-align: center; vertical-align: middle; font-size: 2em;">10.2.e.eng</td> <td data-bbox="1244 1489 1452 1534"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr><td data-bbox="526 1545 782 1579">Functie</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1579 782 1612">Afdeling</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1612 782 1646">Telefoonnummer</td></tr> <tr><td data-bbox="526 1646 782 1691">E-mailadres</td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e.eng	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres								
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e.eng	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.														
Functie																
Afdeling																
Telefoonnummer																
E-mailadres																
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="526 1691 782 1747">(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td data-bbox="1244 1691 1452 1736"><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr><td data-bbox="526 1747 782 1780">Functie</td><td></td><td></td></tr> <tr><td data-bbox="526 1780 782 1814">Afdeling</td><td></td><td></td></tr> <tr><td data-bbox="526 1814 782 1848">Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr> <tr><td data-bbox="526 1848 782 1883">E-mailadres</td><td></td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.														
Functie																
Afdeling																
Telefoonnummer																
E-mailadres																

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

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 | AVD **10.2 .e. en g** 017862
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 | AVD **10.2 .e. en g** 017862
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier \*zie ook de ingevulde bijlage **wijziging (onderaan)**
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6
- Naast de wijziging worden er drie meldingen bij dit project gedaan, zie uitleg onderaan.

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum | 1-3-2017
- Einddatum | 28-2-2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Delineating the function of TGF- $\beta$  receptor-mediated signaling pathways in regenerating skeletal muscle and Duchenne Muscular Dystrophy
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de rol van eiwitsignaalpaden in spierherstel en het ziekteverloop van Duchenne Spierdystrofie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | **10.2 .e. en g**
- Postadres | **10.2 .e. en g**
- E-mailadres | **10.2 .e. en g**

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege  
 Wijziging € 859,00 Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

toezenden aan:

10.2 .e. en g

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en te versturen naar het factuur mailadres.

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam 10.2 .e. en g

Functie 10.2 .e. en g

Plaats 10.2 .e. en g

Datum 21-03-2019

Handtekening 10.2 .e. en g

## Bijlage wijziging CCD projectvergunningaanvraag

De IvD heeft in een plenaire vergadering geconstateerd dat de hieronder vermelde wijzigingen **wel** gevolgen hebben voor het dierenwelzijn, het vergunde aantal dieren, en/of de diersoort, zoals vermeld in de aanvraag met het vergunning nummer: AVD [REDACTED] 2017862.

**De wijziging van bijlage 2 zorgt voor een verhoging van het cumulatieve ongerief, de aanpassingen die horen bij deze wijziging zijn hieronder weergegeven:**

In de experimenten zoals beschreven in bijlage 2 van de CCD-vergunning worden de muizen meerdere malen (max. 5 keer binnen een week) geïnjecteerd met tamoxifen. Daarnaast vindt bij een aantal muizen eenmalig een intramusculaire injectie met cardiotoxine plaats om een tijdelijke spierbeschadiging te induceren en het regeneratieproces te kunnen bestuderen. Het cumulatieve ongerief van deze handelingen was aanvankelijk in de vergunning ingeschat als zijnde 'licht', echter op basis van de huidige normen en verwachtingen (tijdelijke beschadiging in één van de spieren die bijdraagt aan het strekken van de voet, duur max. ~7 dagen) voor het dierenwelzijn wordt dit als 'matig' ingeschat. Het cumulatieve ongerief verschuift hierdoor van 'licht' naar 'matig'. Het aantal dieren en de handelingen t.o.v. de originele CCD vergunning veranderen niet.

**Naast bovengenoemde wijziging zijn er 3 meldingen:**

- 1) Er heeft een verandering plaatsgevonden in de verantwoordelijk onderzoeker van project AVD [REDACTED] 2017862. [REDACTED] heeft deze taak van [REDACTED] overgenomen.
- 2) In de CCD vergunning, appendix 2 staat een groep aangeduid als 'controlegroep 2' welke bestaat uit één van de volgende genotypes +/+;flox/flox of +/+;flox/+. Deze controlegroep zal worden geïnjecteerd met tamoxifen, zoals beschreven in figuur 2 van de appendix en dient als controle voor tamoxifengebruik. Als controlegroep 2 zal in plaats van deze groep gebruik worden gemaakt van de HSA-MCM cre+ muis en de Pax7CreER cre+ muis, geïnjecteerd met tamoxifen. Deze muis is ook te vinden in figuur 2 van de appendix, de cre muis van de F0 generatie. Volgens de literatuur is dit de meest adequate controlegroep voor cre+;fl/fl dieren, omdat bij deze dieren naast tamoxifen ook geactiveerde cre aanwezig is in de cellen, net als bij de experimentele groep. Het aantal dieren blijft onveranderd.
- 3) In de beschrijving van experiment nr. 2 van bijlagen 2 en 3 staat gemeld dat *in situ* krachtmetingen zullen worden uitgevoerd aan de tibialis anterior spier. Echter in het afgelopen jaar hebben wij vanuit een andere project veel ervaring opgedaan met het doen van spierkrachtmeting aan de gastrocnemius medialis en soleus spier. De tibialis is een snel contraherende spier, net als de gastrocnemius medialis. De soleus is een langzaam contraherende spier met een hoog uithoudingsvermogen. Om nu de effecten van de KO genen in zowel snelle als langzame spieren te kunnen begrijpen, zullen de krachtmetingen worden uitgevoerd aan de gastrocnemius medialis en soleus spieren in plaats van aan de tibialis anterior spier. Het aantal dieren blijft onveranderd.

## Format DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
NVWA nummer [redacted] (AVD [redacted] 2017862)
  2. Titel van het project:  
*Delineating the function of TGF- $\beta$  receptor-mediated signaling pathways in regenerating skeletal muscle and Duchenne Muscular Dystrophy*
  3. Titel van de NTS:  
*Onderzoek naar de rol van eiwitsignaalpaden in spierherstel en het ziekteverloop van Duchenne Spierdystrofie*
  4. Type aanvraag:  
*Wijziging van vergunning AVD [redacted] 2017862; de aangepaste tekst t.o.v. het originele DEC-advies is in rood weergegeven.*
  5. Contactgegevens DEC:
    - naam DEC: [redacted]
    - telefoonnummer contactpersoon: 0 [redacted]
    - e-mailadres contactpersoon: [redacted]
  6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
    - ontvangen door DEC: 22-03-2019
    - aanvraag compleet: 22-03-2019
    - in vergadering besproken: *n.v.t. (i.v.m. te weinig projecten ging de DEC vergadering van 9 april niet door, de wijziging is schriftelijk behandeld).*
    - anderszins behandeld: *Schriftelijk behandeld binnen de DEC commissie van 22-03-2019 t/m 10-04-2019*
    - termijnonderbreking(en) van / tot: 29-03-2019 t/m 02-04-2019
    - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
    - aanpassing aanvraag: *n.v.t.*
    - advies aan CCD: 10-04-2019
  7. Afstemming IvD
    - Datum advies IvD: 21-03-2019
    - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager de wijziging van het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
  8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
  9. Correspondentie met de aanvrager
- Vraagronde 1
- Datum: 29-03-2019
  - Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC dat er wat meer informatie komt over waarom het ok is dat er nu opeens minder dieren in bepaalde groepen zitten? Waarom resulteren de verschuivingen in proefgroepen niet in veranderingen in het totaal aantal*



dieren? Is het een compromis om (sommige) proefgroepen te verkleinen? Is dat niet vreemd: dat er nu met een kleinere proefgroep omvang kan worden volstaan? Misschien kan de onderzoeker dit uitleggen? Graag bij onderdeel B de uitleg vermelden (de dieren) en graag nakijken of de statistische toetsing nu nog wel klopt (aangepast is).

- Datum antwoord: 02-04-2019

- *Strekking van de antwoord(en): De verwarring gaat over het aantal te gebruiken dieren over tabel 2 van appendix 2. Voor experimenten 2 en 3 wordt gebruik gemaakt van een experimentele groep en twee controlegroepen, 1 controle voor de genetische achtergrond en 1 voor tamoxifengebruik. Alle dieren in de tabel kunnen positief of negatief zijn voor het enzym cre dat de loxsites moet knippen om een knockout muis te creëren. De experimentele muis voor elke knockout is een cre positieve muis die geïnjecteerd wordt met tamoxifen om het cre te activeren. Oorspronkelijk was één van de controlegroepen een muis met loxsites die negatief is voor cre, geïnjecteerd met tamoxifen. In plaats hiervan zal gebruik gemaakt worden van een muis die geen loxsites heeft maar wel positief is voor cre (HSA-MCM), die geïnjecteerd wordt met tamoxifen, omdat dit een betere controle zou zijn dan een muis zonder Cre. Omdat de nieuwe controlegroep geen loxsites heeft, heeft deze groep een andere officiële stamnaam dan de experimentele dieren waar deze muis bij hoort. Daarom staat hij op een aparte regel in de tabel. Er verandert dus niets aan het aantal groepen, het aantal dieren of het aantal dieren per groep. Ook de statistiek blijft hetzelfde. Wel is het zo dat in het geval dat voor experimentele dieren dezelfde tamoxifen concentratie gebruikt kan worden de HSA-MCM dieren als controle kunnen dienen voor meerdere experimentele groepen waardoor uiteindelijk inderdaad wellicht minder dieren nodig zijn, maar dit is iets wat je niet kan weten voordat experiment 1 van deze appendix is uitgevoerd, daarom hebben we dit niet meegenomen in de berekening van het aantal dieren.*

- *De antwoorden hebben niet geleid tot aanpassing van de aanvraag, de uitleg is helder.*

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

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een wijziging m.b.t. de ongeriefinschatting.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Eén van de DEC leden is betrokken bij dit project, dit lid heeft niet deelgenomen aan de beoordeling van de wijziging.*

## C. Beoordeling (inhoud)

1. *Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

*Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

*Op basis van de huidige normen en verwachtingen voor het dierenwelzijn wordt een deel van de handelingen in dit project nu als 'matig' ingeschat. Door deze wijziging zijn de Niet-technische samenvatting en Appendix 2 aangepast (de veranderingen zijn weergegeven in rode tekst), het projectvoorstel en Appendix 1 en 3 zijn niet aangepast. Naast deze wijziging zijn er nog drie meldingen van toepassing: Er heeft een verandering plaatsgevonden in de verantwoordelijk onderzoeker, verandering van controlegroep 2 en de krachtmetingen worden uitgevoerd aan de gastrocnemius medialis en soleus spieren in plaats van aan de tibialis anterior spier. De DEC is van mening dat deze wijziging en de veranderingen passen onder de hoofddoelstelling van dit project.*

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t.
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

### **Belangen en waarden**

4. *Het directe doel van deze studie het onderzoeken van de TGF- $\beta$  gemedieerde signalering in gezonde en beschadigde spieren en bij Duchenne spierdystrofie (Duchenne Musculaire Dystrofie).*

*Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe therapieën gericht op de remming van de TGF- $\beta$  receptor gemedieerde signaalketens die een rol spelen bij de progressieve pathologie van Duchenne spierdystrofie (DMD) om zo de spierfunctie van de patiënten te verbeteren.*

*Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de rol van signaaleiwitten bij spierdystrofie, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.*

*De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van nieuwe therapieën gericht op de remming van de TGF- $\beta$  receptor gemedieerde signaalketens om daarmee de spierfunctie te verbeteren.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: n.v.t.

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er samengewerkt met de andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. Deze inzichten kunnen in de toekomst bijdragen aan het beschikbaar komen van nieuwe therapieën gericht op het verbeteren van spierfunctie bij patiënten met Duchenne spierdystrofie (DMD). De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de gezien de opbouw en planning van de voorgestelde experimenten.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.*

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geëvalueerd.

*De inschatting van het ongerief als gevolg van de dierproeven is nu hoger ingeschat en als hoger geëvalueerd door de huidige IvD. De inschatting verhoogt naar matig ongerief, vandaar deze wijziging. Het totaal aantal dieren en de handelingen t.o.v. de originele CCD vergunning veranderen niet.*

*Alle dieren (in bijlage 1, 2 en 3) ondervinden licht ongerief als gevolg van transport en terminaal ongerief door het doden na de krachtmetingen die onder anesthesie plaatsvinden. De dieren in bijlage 3 ondervinden daarnaast licht ongerief als gevolg van injecties en bloedafname. De dieren in bijlage 2 worden meerdere malen (max. 5 keer binnen een week) geïnjecteerd met tamoxifen. Daarnaast vindt bij een aantal muizen in bijlage 2 eenmalig een intramusculaire injectie met cardiotoxine plaats om een tijdelijke spierbeschadiging te induceren en het regeneratieproces te kunnen bestuderen. Het cumulatieve ongerief van deze handelingen was aanvankelijk in de vergunning ingeschat als zijnde 'licht', echter op basis van de huidige normen en verwachtingen (tijdelijke beschadiging in een van de spieren die bijdraagt aan het strekken van de voet, duur max. ~7 dagen) voor het dierenwelzijn wordt dit als 'matig' ingeschat. Het cumulatieve ongerief verschuift hierdoor van 'licht' naar 'matig' voor 100% van de dieren in bijlage 2.*

*Het verwachte ongerief voor de dieren in bijlage 2 verhoogt naar matig, het cumulatieve ongerief komt daarmee op licht voor 55% en matig voor 45% van het totaal aantal dieren.*

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren injecties krijgen, er bloed wordt afgenomen en de dieren uiteindelijk gedood worden.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke negatieve veranderingen zijn in activiteit, gewicht, ademhaling of algehele malaise. De kans dat men de humane eindpunten toe zal passen is nihil.*

### **3V's**

14. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

*Men zal in vitro experimenten gebruiken om de responsiviteit van verschillende spiercellen op TGF- $\beta$  receptor gemedieerde signaalketens te bestuderen. Echter voor de complexe biologische processen, betrokken bij spierherstel na schade en de pathologie van Duchenne spierdystrofie, is het gebruik van diermodellen noodzakelijk.*

*De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De onderzoekers kiezen ervoor om muizen te gebruiken, omdat muizen veel overeenkomsten vertonen met mensen betreffende biologische processen, genen/eiwitten en spierfysiologie. Het mdx muismodel is genetisch vergelijkbaar met patiënten met Duchenne spierdystrofie (Duchenne Musculaire Dystrofie). Bovendien heeft men veel ervaring met deze diersoort, waardoor de nieuwe data goed te vergelijken is met eerdere resultaten.*

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

*Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 3142 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zullen de gevolgen van de ingrepen (injecties en krachtmetingen) minimaliseren. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel. Indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: n.v.t.

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

*Alleen mannelijke muizen zullen worden gebruikt. Men gaat de spiercellen van wildtype en floxed muizen vergelijken met die van mdx muizen. De mdx muizen worden gebruikt als model voor Duchenne Musculaire Dystrofie (DMD), dit is een X-gebonden spierziekte die bijna alleen bij jongens voorkomt door de ligging van het betrokken gen op het X-chromosoom. Daarom kiest men ervoor om alleen mannelijke dieren te gebruiken. Daarnaast zijn er intrinsieke verschillen in differentiatie gemeld tussen mannelijke en vrouwelijke satellietcellen in de spier evenals verschillen in spierregeneratie (Deasy et al. J cel Biol. 2007), hetgeen de vergelijking tussen de beide geslachten bemoeilijkt.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

*De dieren worden gedood om hun weefsel (o.a. spieren) verder te kunnen analyseren.*

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

*Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.*

#### **NTS**

21. De aangepaste niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:*

*Rechtvaardigt het onderzoeken van de effecten van signaaleiwitten (TGF- $\beta$  receptor-mediated pathways) op spiercellen en spierherstel het gebruik van maximaal 3142 muizen in de dierproef die daarvan maximaal matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden maximaal matig ongerief tijdens de proef en worden daarna gedood, dit leidt tot nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: mogelijk veel*

*voordeel op de lange termijn, vanwege het beschikbaar komen van nieuwe therapieën om de spierfunctie van patiënten met Duchenne spierdystrofie (DMD) te verbeteren.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 3142 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Om de complexe biologische processen betrokken bij spierherstel en Duchenne spierdystrofie (DMD) te onderzoeken is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het onderzoeken van de effecten van signaaleiwitten (TGF- $\beta$  receptor-mediated pathways) op spiercellen en spierherstel. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van patiënten met Duchenne spierdystrofie (DMD) is afgewogen tegen het, als maximaal matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 3142 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van kennis over de effecten van signaaleiwitten bij spierherstel en spierdystrofie. Daarnaast is er sprake van een indirect maatschappelijk belang, door het mogelijk beschikbaar komen van nieuwe therapieën voor de behandeling van spierdystrofie.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en indirecte maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 3142 muizen en het daarbij verwachte maximale matige ongerief.*

## **E. Advies**

### **1. Advies aan de CCD**

*De DEC adviseert de wijziging van deze vergunning te verlenen.*

*Toelichting bij deze wijziging: Helaas is het ongerieflevel van de experimenten in dit project bij de aanvraag niet goed ingeschat. Er is gebleken dat de dieren in een hogere ongeriefklasse (matig) vallen door de aard van de experimenten voor de dieren in bijlage 2. Hierdoor is het percentage dieren met matig ongerief verhoogd en wijzigt het cumulatieve ongerief in licht voor 55% en matig voor 45% van het totaal aantal dieren. De DEC is van mening dat met name het maatschappelijk belang, de bestrijding van een ernstige spierziekte, voldoende groot is om tegen de vermeerdering van het ongerief op te wegen.*

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Er is geen dilemma geconstateerd.*



> 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-2017862-1

Datum 6 mei 2019

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 21 maart 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delineating the function of TGF- $\beta$  receptor-mediated signaling pathways in regenerating skeletal muscle and Duchenne Muscular Dystrophy" met aanvraagnummer AVD-2017862, waarvoor op 20 februari 2017 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD-2017862-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u het ongerief van de dieren in bijlage 3.4.4.2. te verhogen van licht naar matig. 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 "Delineating the function of TGF- $\beta$  receptor-mediated signaling pathways in regenerating skeletal muscle and Duchenne Muscular Dystrophy" 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 10 april 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 aanpassing van het ongerief een toelaatbare wijziging betreft van het project, waarvoor op 20 februari 2017 een vergunning is verleend.

#### Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):



**Datum**

6 mei 2019

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD-07862-1

<b>Naam dierproef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Ernst</b>
3.4.4.2. Conditional knockout of ALK4 and ALK5 receptors in skeletal muscle cells	muizen	1422	100% Licht-Matig

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](http://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:

Drs. F. Braunstahl

Bijlage

- DEC-advies

**Datum**  
6 mei 2019

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1[REDACTED]207862-1



Centrale Commissie Dierproeven

## Weergave wet- en regelgeving

Aanvraagnummer  
<aanvr nr>



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 Provide the title of the project. Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress.

### 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.

Preterm delivery is the primary cause of neonatal morbidity and mortality (1). The most frequent cause (60%) of preterm delivery is chorioamnionitis, a bacterial infection of the amniotic fluid, placenta and fetal membranes (2). Since amniotic fluid enters the lung during fetal breathing movements, lung

exposure to microorganisms occurs during chorioamnionitis. In particular, examination of tracheobronchial fluid after birth showed the presence of white blood cells and microorganisms in patients with intra-amniotic infections (3). This finding was confirmed and extended in large animal models in which microorganisms were located in the fetal lungs following intra-amniotic injections demonstrating that infected/inflamed amniotic fluid can reach the distal respiratory tract (4). Importantly, direct exposure of the fetal lung to microorganisms or their toxic components leads to lung inflammation and concomitant large, simplified alveolar structures, dysmorphic capillary configuration and variable interstitial cellularity and/or fibroproliferation (5, 6). Additionally, fetal lung inflammation and subsequent detrimental outcomes might originate from systemic fetal immune activation in the course of chorioamnionitis (7-9). Clinically, preterm birth and chorioamnionitis are both associated with bronchopulmonary dysplasia (BPD) (7, 10-12). BPD is usually defined as need for supplemental oxygen for 28 days (13) after birth, or at 36 weeks of gestation, with an additional severity scoring by a room air test (14). The lungs of these vulnerable preterm infants are often exposed to additional postnatal injurious hits including mechanical ventilation, hyperoxia and infections, resulting in a self-perpetuating cycle of lung inflammation, disturbed pulmonary development and injury and increased predisposition to BPD and adult-onset respiratory diseases (8, 15). For example, prolonged mechanical ventilation increased the risk of BPD in a clinical study, and this effect was stronger when chorioamnionitis was present (15). Multiple interventions, such as antenatal steroids, vitamin-A, or nutritional support have been proposed to prevent or treat adverse outcomes of premature lung injury. However, the effects on long term outcome were modest (16) (7). In our translational ovine chorioamnionitis model, we showed that intra-amniotic delivery of Lipopolysaccharide (LPS) resulted in systemic and pulmonary inflammation and disruption of developmental pathways, such as Wingless-Int and Sonic hedgehog signaling (16, 17).

Taken together, pharmacological effects can be achieved via different pathways, even in the absence or without notification of anti-inflammatory effects. This study will provide unique, time related insight which cannot be achieved in humans.

Collectively, these findings prompt us to investigate the contribution

Since perinatal events induce pulmonary and systemic inflammation with structural disturbances and injury of the premature lung, we consider that a successful intervention must possess anti-inflammatory and regenerative capacities. These criteria are met by mesenchymal stromal cells (MSC). Multiple studies provide consistent evidence that MSCs are a promising therapy for immune and inflammatory-based disorders of the lung (18). Recently, a clinical trial demonstrated that postnatal intra-tracheal administered MSCs reduce neonatal pulmonary inflammation without adverse effects (19). However reduction of pulmonary inflammation upon MSC treatment was found without significant improvement in lung function (19).

We hypothesize that perinatal inflammation

leading to the observed disrupted pulmonary development. Considering the need to regenerate injured premature lungs in the context of perinatal inflammation, we hypothesize that multipotent adult progenitor cells (MAPCs) are a promising therapy to treat adverse lung outcomes following pro-inflammatory perinatal stress, including inflammation and ventilation-induced trauma, given their anti-inflammatory and regenerative capacities. We therefore will test administration of MAPC during pregnancy and following preterm birth. Biomarker studies for the detection of amniotic fluid infections are currently conducted and these biomarkers will determine clinical policy, including intravascular intrauterine transfusion (IUT) into the umbilical cord, which is standard care in specialized centers to treat fetal disease (e.g. anemia). In addition, since the etiology of BPD comprises both pre-and postnatal factors, we hypothesize that combined prenatal and postnatal MAPC treatment will act synergistically. Therefore, we will test combined prenatal and postnatal MAPC administration.

We will assess pulmonary outcomes during pregnancy, short-term 5 days after preterm delivery and long-term after 1 year survival.

For these studies we will intravenously (i.v.) multipotent adult (MAPC), which are well-characterized human adherent bone marrow-derived cells of an earlier developmental stage than MSCs (20). In comparison to MSCs, MAPCs have stronger anti-inflammatory effects and are more potent at promoting tissue repair (21). Furthermore, MAPCs have a high expansion

potential and their immunological properties make it possible to use them as a universal allogenic donor (20). In addition, we have chosen to use this MAPC product in this study as they are Federal Drug Approved. In a clinical trial in the UK and in the US, application of MAPCs improved the functional outcome after stroke in adult patients and no signs of adverse outcomes were reported within a follow up period of 1 year. Importantly, therapeutic effects of MAPCs have been shown in an ex vivo human lung explant model of prolonged cold storage and subsequent reperfusion (22). In addition, safety and efficacy of human MAPC xenotransplantation has been demonstrated in preclinical models of brain and lung injury in sheep (21, 23) and traumatic brain injury in mice and rats (24, 25). Analysis of MAPC bio distribution 24 hours after systemic administration demonstrated that the largest numbers of cells were found in the lungs and spleen (25). Systemically administered MAPCs are typically cleared within 48-72h after administration (26, 27). Importantly, the fact that MAPCs possess pharmacological effects without engraftment eliminates the general concern of cell-based therapies regarding the fate of the transplanted cells and make them an interesting as a therapy.

In the proposed study we will investigate whether MAPCs improve pulmonary outcomes and investigate whether this postulated pharmacological effect is mediated by **10.2 .e. en g** through pulmonary or extra-pulmonary anti-inflammatory effects.

Both systemic and intra-tracheal MSC administration reduces inflammation and injury in a wide spectrum of preclinical lung injury models (28, 29). However the proposed intravenous route is less complex for physicians and causes less discomfort for patients. Furthermore, such a minimal invasive route may allow a more efficient scheduling of the transplantation procedure, which further advances the potential of using adult stem cells for clinical use. Moreover, MAPCs will migrate to extra pulmonary injured organs following systemic administration where they interact with immunologic cells of peripheral immune organs such as the spleen (24). In line, previous work in our ovine model of global hypoxia-ischemia and studies in mice by others have shown that intravenous delivery of MAPCs results in increased systemic anti-inflammatory cytokines, induction of T-regs and T-cell anergy (21, 24) which are considered to contribute to improved pulmonary outcome in the course of chorioamnionitis (30).

However, the long term effects of MAPCs in these asphyxiated animals were not studied. As such, the short and long term pulmonary effects of MAPC administration in the context of chorioamnionitis and postnatal ventilation will be studied for the first time.

### 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?

Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a novel cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being in utero. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. To test these different pharmacological regimens, effects of stem cell treatment need to be compared in the proposed groups.

Besides BPD, perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies, including pulmonary hyper-reactivity. These later airway diseases become apparent during adulthood. Therefore, a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimens that will be tested is essential.

This promising cell-based therapy will be tested in our well characterized pre-clinical model of adverse pulmonary outcomes of the premature lung, which is the most common adverse outcome after preterm birth.

To reach our main goal we have formulated the following experimental aims:

**AIM 1: To assess the effects of *in utero* stem cell treatment on pulmonary outcomes during pregnancy.**

**AIM 2: To assess the effects of stem cell treatment on short-term neonatal pulmonary outcomes**

AIM 2A: To assess the effects of *in utero* stem cell treatment on short-term pulmonary outcomes.

AIM 2B: To assess the effects of postnatal stem cell treatment on short-term pulmonary outcomes.

AIM 2C: To assess of combined *in utero* and postnatal stem cell treatment on short-term postnatal outcomes.

**AIM 3: To assess the effects of stem cell treatment on long-term pulmonary outcomes**

AIM 3A: To assess the effects of *in utero* stem cell treatment on long-term pulmonary outcomes.

AIM 3B: To assess the effects of postnatal stem cell treatment on long-term pulmonary outcomes.

AIM 3C: To assess of combined *in utero* and postnatal stem cell treatment on long-term postnatal outcomes.

These three experimental aims will be investigated in a well-established ovine model comprising intra-uterine inflammation, postnatal ventilation, and subsequent survival.

All experiments have been conducted successfully before by an existing highly specialized and experienced team comprising pediatricians, neonatologists, bio-technicians, veterinarians, and basic scientists. This group has a large track record of ovine surgery (fetal instrumentation (21, 30, 31), Caesarean section) (32), postnatal ventilation (33, 34), and subsequent survival (35).

We have developed a specialized Lamb Intensive Care Unit (LICU), which is equipped identically to the neonatal intensive care unit (NICU) and meets all requirements that are needed to support preterm ovine fetuses.

Our staff has been trained extensively to recognize and react to (clinical) symptoms of both fetal and maternal discomfort according to standardized protocols. Recognition of discomfort and a subsequent proper reaction reduces the risk of complications and improves animal well-being. □The proposed study is feasible and realistic considering the long-standing expertise of the research group.

### 3.3 Relevance

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

Yearly, 18.000 babies are born preterm (<37 weeks gestational age) in the Netherlands. These babies require substantial clinical care. Despite advances in clinical care (e.g. antenatal corticosteroid treatment), these babies are at risk for adverse lung outcomes, such as BPD, which occurs in 20% of preterm infants. These adverse lung outcomes represent a substantial life-long burden to babies, families and society since survivors of BPD are at high risk to develop early onset emphysema and asthma. These outcomes arise primarily from immaturity and perinatal injury which can be induced by intra-uterine inflammation, hypoxia-ischemia during delivery, postnatal events including mechanical ventilation or a combination of these causes. Unfortunately, no therapy exists for preterm infants with adverse lung outcomes. We developed a translational chorioamnionitis model in preterm sheep. This model allows complex *in utero* surgery which is essential for the phenotype of our model and the delivery of our pharmacological compound. Moreover, this large animal model closely resembles the human situation in terms of lung development and induction of pulmonary inflammation and injury following chorioamnionitis and enables investigation of different crucial aspects of clinically relevant stressors in the pre- and postnatal phase. These elements are essential for the development of new therapeutic interventions for pulmonary pathologies in preterm infants, with a well-characterized and standardized cell preparation that is available "off the shelf". A successful outcome of this project will serve as proof-of-principle for future clinical trials. The basic approach to pulmonary injury in this project is of high interest for clinicians, such as obstetricians, neonatologists, pediatric intensive care specialists, child pulmonologists, parent groups (Couveuse children, European Foundation for the Care of Newborn Infants) and rehabilitation physicians, who are focused on the regeneration of the developing lung and improving pulmonary-developmental outcome for preterm infants suffering from BPD. Moreover, the acquired knowledge and interventions are of potential use for other immune-related pulmonary pathologies in adults. Furthermore, disturbed repair and regeneration of injured fetal lung tissues that will be studied and targeted in the proposed project is also causally involved in the pathogenesis of adult pulmonary diseases including acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Therefore, the acquired mechanistic insight and the tested interventions are also of potential importance for adverse pulmonary outcomes outside the neonatal

care. Also, as antenatal infection/inflammation and postnatal mechanical ventilation are known to provoke clinically relevant injury of other organs including the brain and gut (30, 36-39), these animals will also be used to study extra pulmonary organs in order to reduce neonatal pathologies in general.

Additionally, *in vitro* or *ex-vivo*-culture studies, performed with tissues obtained from this study, will further unravel the immunomodulatory and regenerative properties of MAPCs. Pulmonologists can then adopt the findings of our study and investigate the therapeutic effect of MAPCs into more conditions of lung injury. Furthermore, we have established an array of outcome parameters including lung histology, lung function, and endogenous pulmonary stem cell function. These outcome parameters can be adopted by other research groups for experimental purposes and be evaluated in clinical practice which is mediated in part by the perinatal research platform.

Collectively, there is an urgent need for new therapeutic approaches for BPD. 10.2 .e. en g

This clinical trial will make a cell-based treatment available to all preterm babies in need by using the intravenous administration route evaluated in this project. The proposed route of i.v stem cell delivery has extensively been shown to be effective in the treatment of diseases of the lung and other organs. Importantly, peripheral delivery is less complex for physicians and causes less discomfort for the patient.

### 3.4 Research strategy

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

Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a novel cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being *in utero*. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. In addition, since perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies (e.g. pulmonary hyper-reactivity) that become apparent in later life (i.e. during adulthood), a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimens that will be tested is essential. As such, the effects of prenatal, postnatal or combine pre- and postnatal MAPC administration will be investigated immediately after birth (AIM 1), during early postnatal life (AIM 2) and at adulthood in comparison to term born reference lambs to correct for possible long-term effects of preterm birth alone. (AIM 3).

#### 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.

We will explore the protective potential of multipotent adult progenitor cells (MAPCs) on the structural and functional outcome of the preterm lung in our ovine model. Since postnatal pulmonary inflammation originates during pregnancy, we will administer MAPCs at the earliest possible moment, being in utero and/or directly after preterm birth. We want to investigate (in the circulation) the effects of perinatal stress on pulmonary and immunological outcome during the transition from fetus into childhood till adulthood. Perinatal stress is associated with direct pulmonary pathologies, including BPD, and with increased risk of lung pathologies at adulthood, including airway hyper-reactivity. As a consequence, such latter disturbances can only be proven at adulthood, which is from 1 year onwards in sheep. Therefore, the pharmacological effects will be studied during pregnancy (AIM 1), on early postnatal life (AIM 2) and at adulthood in comparison to term born reference lambs to correct for possible long-term effects of preterm birth alone. (AIM 3).

The basic outline of the study has is illustrated in figure 1



# 10.2 .e. en g

Figure 1 10.2 .e. en g



## Fetal instrumentation

10.2 .e. en g



## Prenatal stress (infection/inflammation)

10.2 .e. en g



## Postnatal stress (mechanical ventilation)

To mimic clinical postnatal stress at the neonatal intensive care unit in detail, lambs will receive optimal clinical care including prenatal maternal corticosteroid treatment, mechanical ventilation, surfactant replacement therapy and daily antibiotics directly after birth within the neonatal support period, according to our established preterm lamb intensive care protocols. All lambs will be ventilated for 5 days.

## MAPC treatment

10.2 .e. en g



## Postnatal survival

As illustrated by aim 3, treatment effects of stem cells will be assessed long-term. For this purpose the lambs survive for 1 year following postnatal ventilation.

## Outcomes

Experimental outcomes will be assessed:

1. Immediately after preterm birth
2. Short-term: 5 days after preterm birth
3. Long-term: 12 months after preterm birth

The primary outcomes for all aims in this study are lung inflammation, lung development, pulmonary vasculature, lung function, lung injury, lung remodeling, and systemic inflammation. In addition, we will test the effects of MAPC treatment on airway reactivity at adulthood. Moreover, to delineate whether the postulated pharmacological effects of stem cells are directly mediated via endogenous stem/progenitors cells, we will culture lung organoids out of post-mortem tissue of our lambs.

In addition, we will assess neurodevelopment as a secondary outcome parameter.

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.

Current therapeutic options to prevent or treat preterm infants with adverse lung outcomes are limited and have salient side effects, emphasizing the need for new therapeutic approaches. Given their anti-inflammatory and regenerative capacities, we will explore the protective potential of multipotent adult progenitor cells (MAPCs) on the structural and functional outcome of the preterm lung in our ovine model. Since postnatal pulmonary inflammation originates during pregnancy, we will administer MAPCs at the earliest possible moment, being *in utero* and study pharmacological effects during pregnancy (**AIM 1**), on early postnatal life (**AIM 2**) and at adulthood (**AIM 3**).

As chorioamnionitis driven inflammatory changes of the fetal lung can be amplified or aggravated by postnatal triggers, we hypothesize that combined prenatal and postnatal MAPC treatment will act synergistically. Therefore, effects of combined *in utero* and immediate postnatal MAPC administration on the pulmonary outcome will be studied for short term postnatal outcome (**AIM 2C**) and during adulthood (**AIM 3C**).

**Go or no go's and milestones**

Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. As a consequence, the different aims need to be investigated independently in order to define the best pharmaceutical regime.

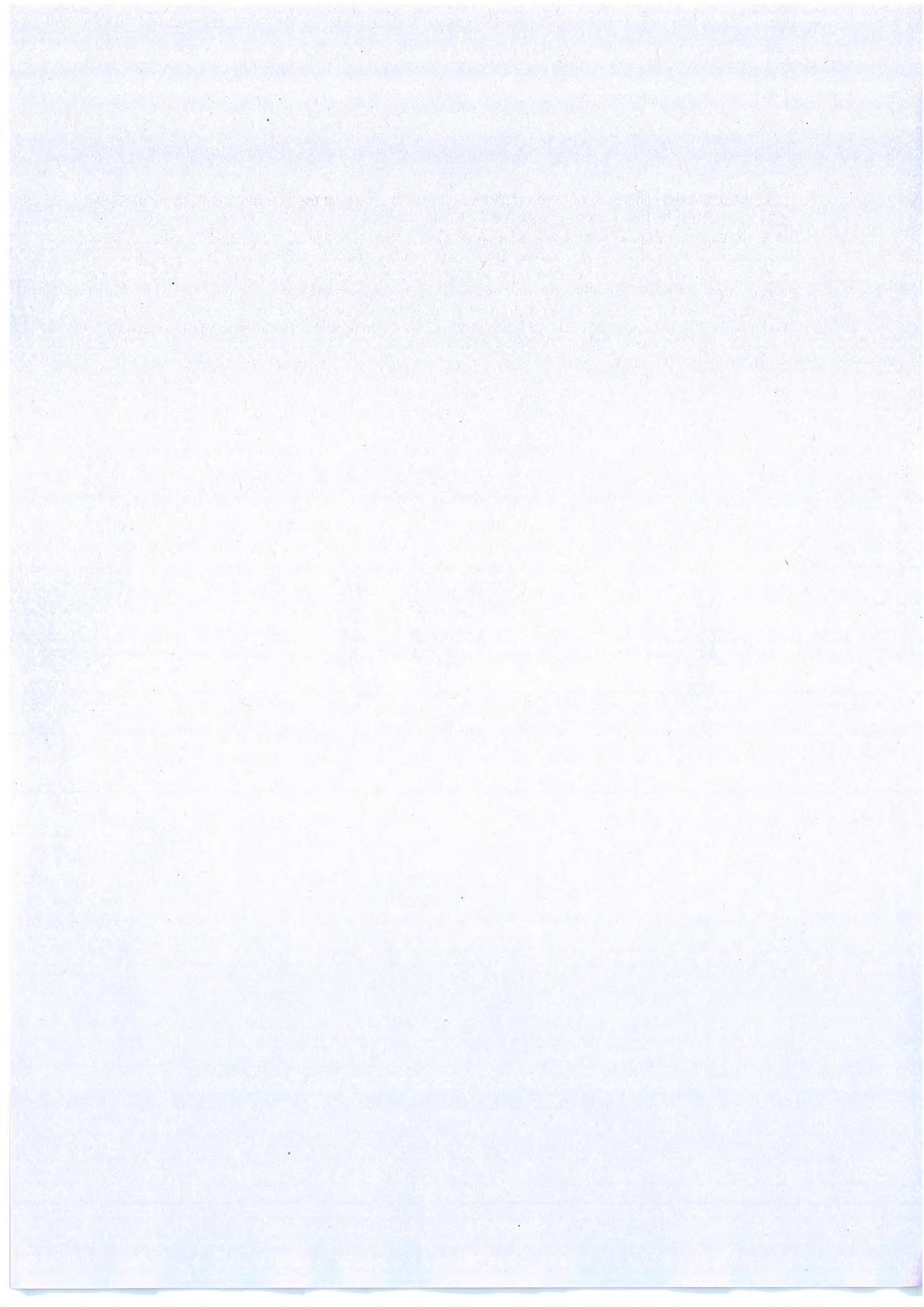
In addition, pharmacological effects of perinatal treatment might emerge at different stages, and for instance become apparent for the first time during adulthood.

Therefore, in Aim 1 the effects of stem cell treatment *in utero* will be examined. Pharmacological effects need to be examined in the acute phase (during pregnancy, AIM 1) and at a later time point, being postnatally (AIMS 2A and 3A). The effects of postnatal stem cell treatment will be studied within 5 days after treatment (AIM 2B) or at adulthood (1 year, AIM 3B). Finally, the potential synergistic effects between combined *in utero* and postnatal treatment will be examined (AIMS 2C and 3C).

The MRI pilot study is necessary to optimize *in vivo* MRI scanning protocols and practical processes concerning the handling of the animals. Our team of experienced laboratory animal experts, neonatologists, pediatric neurologists and (neuro-) radiologists will continuously evaluate and optimize handling and image quality during the pilot study. As soon as the pilot study shows that we are capable of producing high quality MRI images of the brain of ventilated lambs, there is a **GO moment** for the application of *in vivo MRI* in aim 3 of the project proposal. Besides MRI, we will assess functional neurodevelopment with gait analysis. Feasibility of gait analysis will be tested on 1 experimental long-term animal with established movement abnormalities in comparison to healthy term controls. Feasibility of gait analysis will serve as a GO-moment for the application of gait analysis in the entire long-term cohort.

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	Perinatal stress with postnatal survival
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



# DEC-advies Wijziging op PV 2016-016

10.2 .e. en g

AVD107002016784-8

---

## **Preambule:**

De DEC-UM heeft in rood de opmerkingen voor de wijzigingen in dit formulier opgenomen. De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

## **A. Algemene gegevens over de procedure**

- 1. Aanvraagnummer:** 10700
- 2. Titel van het project:** *Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress.*
- 3. Titel van de NTS:** *Stamceltherapie voor de behandeling van longschade bij te vroeg geboren baby's.*
- 4. Type aanvraag:**  
 **wijziging** van vergunning met nummer AVD107002016784
- 5. Contactgegevens ambtelijk secretaris DEC-UM:** [REDACTED]  
[secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl](mailto:secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl)
- 6. Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC-UM 20-08-2020 (incompleet)
  - aanvraag compleet op 8 september 2020
  - in vergadering besproken 28-08-2020
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en):
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD op 14-09-2020
- 7. Afstemming IvD:**  
De IvD geeft aan dat de aanvrager de uitbreidingsaanvraag heeft afgestemd en dat deze instemming heeft van de IvD.
- 8. Eventueel horen van aanvrager:** n.v.t.
- 9. Correspondentie met de aanvrager:**
  - Datum: 31-08-2020
  - Verstreckte antwoorden: 02-09-2020
  - De correspondentie betrof met name opheldering over het aantal proefdieren en de onderbouwing daarvan.
- 10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC-UM):** n.v.t.

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

- 1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.** JA
- 2. De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.**
- 3. Is de DEC-UM competent om hierover te adviseren?** JA
- 4. Geef aan of DEC-UM leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.** NEE

## C. Beoordeling (inhoud)

- 1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.**  
Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De huidige wijziging omvat een uitbreiding van de studie met een additionele groep à term geboren lammeren en hun moeders, die als controle zullen dienen voor de effecten van vroeggeboorte op zichzelf, hetgeen passend is binnen het project.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

- 2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.**

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

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

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.

### **Belangen en waarden**

- 4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.**

Zie antwoord op vraag C5.

- 5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.**

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op inzicht in nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan de longen na vroeggeboorte, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, enerzijds pasgeborenen en anderzijds

volwassenen die lijden aan longziekten en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Ze zullen ongerief ondervinden dat voor de ooien en eenjarige lammeren wordt geclassificeerd als matig en voor de pasgeboren lammeren als gering.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over mogelijke methoden om longproblemen te verhelpen. Uiteindelijk kan deze kennis leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden bij schade aan de longen, niet alleen in de neonatologie maar mogelijk ook breder in de behandeling van longaandoeningen.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Meer kennis over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan de longen kan bouwstenen leveren voor effectieve therapie en daarmee leiden tot minder ziektelast en gunstigere levensverwachting. Daardoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Longproblemen komen veel voor.

Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

**6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.**

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

***Proefopzet en haalbaarheid***

**7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe.**

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

**8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe.**

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project. Middels toevoeging van de groep à term geboren lammeren wordt correctie voor vroeggeboorte meegenomen in het experimentele design. Aldus kunnen extra klinisch relevante vragen worden beantwoord.

### **Welzijn dieren**

- 9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe.**

n.v.t.

- 10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.**

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is. De 7 à term geboren lammeren en hun moeders zullen eender worden gehuisvest.

- 11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.**

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Het ongerief in de wijzigingsaanvraag, licht voor de ooiën en matig voor hun lammeren, komt de DEC-UM correct over, waarbij opgemerkt moet worden dat de 7 à term geboren lammeren geen foetale instrumentatie zullen ondergaan.

- 12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.**

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd. Dit is niet van toepassing op de 7 ooiën die deel uitmaken van de wijzigingsaanvraag, terwijl de 7 à term geboren lammeren in hun integriteit zullen worden aangetast (door herhaalde longfunctiemetingen, bloedafnames, MRI en EEG) en zullen worden opgeofferd aan het eind van de proef.

- 13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe.**

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag. De in de oorspronkelijke aanvraag beschreven humane eindpunten voor de lange termijn overleving zijn ook toepasselijk op de 7 à term geboren lammeren van de wijzigingsaanvraag.

### **3V's**

- 14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.**

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel. Dit geldt ook voor de additionele groep à term geboren lammeren, die als controle zullen dienen voor de effecten van vroeggeboorte op zichzelf, want er is geen geschikt vervangingsalternatief voor de lange termijn monitoring middels de beoogde functionele metingen.

Men heeft het aantal benodigde dieren zelfs kunnen reduceren van 10 naar 7, omdat men weefsels heeft verkregen uit controle lammeren uit een andere studie.

**15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord.**

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse. De groeps grootte voor deze wijziging is berekend met de formule van Sachs met pulmonale inflammatie, schade en functie als primaire uitkomstmaten.

**16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe.**

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken. In de additionele groep à term geboren lammeren zal foetale instrumentatie achterwege blijven, hetgeen passend is bij verfijning.

**17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.**

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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

**18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.**

In onderhavige projectaanvraag worden (behoudens als vanzelfsprekend de drachtige oeien) geen dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Alhoewel de DEC-UM vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.



**19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.**

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. De additionele groep à term geboren lammeren zal gedood worden in het kader van de proef onder meer ter bestudering van het achterwege blijven van hersenschade als controle. Voor de additionele groep oaien zal een nieuwe bestemming gezocht worden na de proef.

**20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.**

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar in het belang van het onderzoek één of meerdere vitale organen moeten worden uitgenomen voor analyse, hetgeen het welzijn na adoptie in de weg staat.

#### **NTS**

**21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?**

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

## **D. Ethische afweging**

### **1. Benoem de centrale morele vraag.**

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan de longen, de opoffering en het milde tot matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress?".

### **2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.**

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: substantieel voordeel.

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: substantieel voordeel.

Algemeen: relevante groei van medische kennis.

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na gering en matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt geschaad door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en het opofferen aan het eind van de proeven. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over nieuwe methoden om de longfunctie van vroeg-geborenen en andere personen die lijden aan longziekten te verbeteren. Hierdoor kan de levensverwachting, de ziektelast en ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Longaandoeningen zijn een belangrijke oorzaak van functieverlies en sterfte. In de neonatologische en pulmonologische kliniek is op dit punt behoefte aan meer kennis en effectievere therapie. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

### **3. Beantwoord de centrale morele vraag.**

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan de longen, de opoffering en het milde tot matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress?" bevestigend. Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress" als ethisch gerechtvaardigd.

Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress" van een positief advies inclusief de huidige wijziging omvattend een uitbreiding van de studie met een additionele groep à term geboren lammeren en hun moeders.

## **E. Advies**

### **1. Advies aan de CCD**

De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen.

### **2. Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen.**

### **3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.**

N.v.t. Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.

## Bijlage I:

### Vragen DEC-UM d.d. 16-11-2016 en antwoorden VO d.d. 27-11-2016

#### 3 Algemene projectbeschrijving

##### 3.1 Achtergrond

###### Vragen:

1. **De DEC-UM vraagt de onderzoekers toe te lichten waarom humane MAPC gebruikt kunnen worden in dit PV waarin schapen gebruikt worden. Er wordt verwezen naar niet gepubliceerde data. Wat is er bekend over kruis-reactiviteit, specificiteit, maturatie van MAPC, etc.**

**Antwoord:** Safety and efficacy of human MAPC xenotransplantation has been demonstrated in preclinical models of brain and lung injury in sheep (1, 2) and traumatic brain injury in mice and rats (3, 4).

Analysis of MAPC biodistribution 24 hours after systemic administration demonstrated that the largest number of cells were found in the lungs and spleen (4). Systemically administered MAPCs are typically cleared within 48-72h after administration (5, 6). Importantly, the fact that MAPCs possess pharmacological effects without engraftment eliminates the general concern of cell-based therapies regarding the fate of the transplanted cells and make them an interesting as a therapy.

The arguments described above have been incorporated into section 3.1 of the project proposal as follows: *"In addition, safety and efficacy of human MAPC xenotransplantation has been demonstrated in preclinical models of brain and lung injury in sheep (1, 2) and traumatic brain injury in mice and rats (3, 4). Analysis of MAPC biodistribution 24 hours after systemic administration demonstrated that the largest numbers of cells were found in the lungs and spleen (4). Systemically administered MAPCs are typically cleared within 48-72h after administration (5, 6). Importantly, the fact that MAPCs possess pharmacological effects without engraftment eliminates the general concern of cell-based therapies regarding the fate of the transplanted cells and make them an interesting as a therapy."*

2. **Er wordt gesteld dat een succesvolle interventie een anti-inflammatoir effect dient te hebben. Hoewel een recentelijke klinische trial met MSCs dat had (reductie inflammatie), liet deze geen functionele verbetering in de uitkomst zien. Suggereert dit geen andere pathway?**

**Antwoord:** Multiple interventions, such as antenatal steroids, vitamin-A, or nutritional support have been proposed to prevent or treat adverse outcomes of premature lung injury. However, the effects on long term outcome were modest (7).

In our translational ovine chorioamnionitis model, we showed that intra-amniotic delivery of Lipopolysaccharide (LPS) resulted in systemic and pulmonary inflammation and dysruption of developmental pathways, such as Wingless-Int and Sonic hedgehog signaling (8, 9). 10.2.e.eng

Taken together, pharmacological effects can be achieved via different pathways, even in the absence or without notification of anti-inflammatory effects. This study will provide unique, time related insight which cannot be achieved in humans.

The arguments described above have been incorporated into section 3.1 of the project proposal as follows: "*Multiple interventions, such as antenatal steroids, vitamin-A, or nutritional support have been proposed to prevent or treat adverse outcomes of premature lung injury. However, the effects on long term outcome were modest (7).*

*In our translational ovine chorioamnionitis model, we showed that intra-amniotic delivery of Lipopolysaccharide (LPS) resulted in systemic and pulmonary inflammation and disruption of developmental pathways, such as Wingless-Int and Sonic hedgehog signaling (16, 17). Additionally, overexpression of the basal cell marker p63 was found in this model. This finding was confirmed and extended in a pilot study using autopsy material from BPD patients and gestation-matched non-BPD controls (unpublished data). The apparent disruption of essential developmental processes in the fetal lung highlights its regenerative demand.*

*Taken together, pharmacological effects can be achieved via different pathways, even in the absence or without notification of anti-inflammatory effects. This study will provide unique, time related insight which cannot be achieved in humans."*

### **3. Worden mogelijke neveneffecten van de behandeling buiten de longen om ook bekeken?**

**Antwoord:** The study is primarily designed to study effects of antenatal, postnatal and combined antenatal – postnatal stress on the pulmonary outcome. However, these exposures i.e. 7d of antenatal infection/inflammation and 5d of postnatal mechanical ventilation are known to provoke clinically relevant injury of other organs including the brain and gut (10-13). Therefore, these animals will also be used to study extra pulmonary organs in order to reduce neonatal pathologies in general.

### **3.2 Doel**

#### **Algemene opmerking:**

#### **1. AIM 2; Gaarne specificeren dat dit neonatale periode betreft (i.t.t. AIM 1).**

**Antwoord:** We have adjusted AIM2 as follows: "*AIM 2: To assess the effects of stem cell treatment on short-term neonatal pulmonary outcomes.*"

#### **Vragen:**

#### **1. De DEC-UM vraagt de onderzoekers toe te lichten waarom AIM 2B en AIM 3B nodig zijn, aangezien er in de achtergrond wordt aangegeven dat postnatale toediening remissie geeft van ontsteking, maar geen effect heeft op long functie. Doel van dit experiment is de combinatie van pre en postnatale toediening van MAPCs.**

**Antwoord:** Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a **novel** cell-based therapy (MAPC) on these **individual factors**. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being in utero. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. To test these different pharmacological regimes, effects of stem cell treatment need to be compared in the proposed groups. Besides BPD, perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies, including pulmonary hyper-reactivity. These later airway diseases become apparent during adulthood. Therefore, a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimes that will be tested is essential.

The arguments described above have been incorporated into section 3.2 of the project proposal as follows: *"Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a novel cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being in utero. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. To test these different pharmacological regimens, effects of stem cell treatment need to be compared in the proposed groups. Besides BPD, perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies, including pulmonary hyper-reactivity. These later airway diseases become apparent during adulthood. Therefore, a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimens that will be tested is essential. This promising cell-based therapy will be tested in our well characterized pre-clinical model of adverse pulmonary outcomes of the premature lung, which is the most common adverse outcome after preterm birth."*

**2. Waarom zou men niet eerst testen of de neonaat gebaat is bij behandeling (AIM 2; klinisch meest relevant) en zo ja, dan kijken wat er tijdens zwangerschap gebeurt (AIM 1)?**

**Antwoord:** Clinically, preterm birth and chorioamnionitis are both associated with BPD. The lungs of these vulnerable preterm infants are often exposed to additional postnatal injurious hits including mechanical ventilation, hyperoxia and infections, resulting in a self-perpetuating cycle of lung inflammation, disturbed pulmonary development and injury and increased predisposition to BPD and adult-onset respiratory diseases.

In line, prolonged mechanical ventilation increased the risk of BPD in a clinical study, and this effect was stronger when chorioamnionitis was present.

Therefore, we will target, inflammation and regeneration prenatally, postnatally or both. This setup with the different aims is essential to gain insight in the pharmacological effects of stem cell treatment and to define the best pharmacological regime.

**3.3. Belang**

**Vraag:**

**1. Worden ook andere weefsels bekeken (b.v. hersenen)?**

**Antwoord:** The study is primarily designed to study effects of antenatal, postnatal and combined antenatal – postnatal stress on the pulmonary outcome. However, these exposures i.e. 7d of antenatal infection/inflammation and 5d of postnatal mechanical ventilation are known to provoke clinically relevant injury of other organs including the brain and gut (10-13). Therefore, these animals will also be used to study extra pulmonary organs in order to reduce neonatal pathologies in general.

The arguments described above have been incorporated into section 3.2 of the project proposal as follows: *"Also, as antenatal infection/inflammation and postnatal mechanical ventilation are known to provoke clinically relevant injury of other organs including the brain and gut (8-11), these animals will also be used to study extra pulmonary organs in order to reduce neonatal pathologies in general."*

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

#### **3.4.1**

**Vraag:**

- 1. De DEC-UM vraagt de onderzoekers aan te geven waarom AIM 2A en 3B nodig zijn. Ook de afzonderlijke prenatale toediening onder AIM1A en C en 3A en C moeten beter aangegeven worden: waarom kunnen de onderzoekers niet volstaan met AIMS 2C en 3C?**

**Antwoord:** Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a **novel** cell-based therapy (MAPC) on these **individual factors**. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being in utero.

Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. To test these different pharmacological regimes, effects of stem cell treatment need to be compared in the proposed groups.

Besides BPD, perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies, including pulmonary hyperreactivity. These later airway diseases become apparent during adulthood. Therefore, a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimes that will be tested is essential.

Aims 1A and 1C do not exist in our project proposal.

The arguments described above have been incorporated into section 3.4.1 of the project proposal as follows: "*Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a novel cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being in utero. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration.*

*In addition, since perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies (e.g. pulmonary hyper-reactivity) that become apparent in later life (i.e. during adulthood), a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimens that will be tested is essential. As such, the effects of prenatal, postnatal or combine pre- and postnatal MAPC administration will be investigated immediately after birth (AIM 1), during early postnatal life (AIM 2) and at adulthood (AIM 3)."*

#### **3.4.2**

**Vraag:**

- 1. De DEC-UM vraagt de onderzoekers beter aan te geven waarom juist voor deze twee tijdstippen is gekozen (5d en 1y). Vooral het latere tijdstip is cruciaal en de DEC-UM vraagt zich af waarom dit niet na bijv. 6 maanden gemeten kan worden.**

**Antwoord:** We want to investigate (in the circulation) the effects of perinatal stress on pulmonary and immunological outcome during the transition from fetus into childhood till adulthood. Perinatal stress is associated with direct pulmonary pathologies, including BPD, and with increased risk of lung pathologies at adulthood, including airway hyperreactivity. As a consequence, such latter disturbances can only be proven at adulthood, which is from 1 year onwards in sheep.