

<b>Inventaris Wob-verzoek W23-03</b>		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>				
<b>nr.</b>	<b>document NTS 202215869</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>5.1, lid 1c</b>	<b>5.1, lid 2e</b>	<b>5.1, lid 2f</b>	<b>5.1, lid 2h</b>	<b>5.2, lid 1</b>
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 17-02-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
4	NTS bij aanvraag			x						
5	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 18-02-2022				x		x		x	
6	DEC-advies, d.d. 25-3-2022				x		x		x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				x				x	
9	NTS na DEC advies			x						
10	E-mail vergunninghouder aan CCD, d.d. 31-03-2022				x		x		x	
11	E-mail CCD n.a.v. verzoek vergunninghouder, d.d. 01-04-2022				x		x		x	
12	Adviesnota aan CCD met opmerkingen, d.d. 31-03-2022				x		x		x	x
13	Adviesnota aan CCD, d.d. 01-04-2022				x		x		x	x
14	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvergunning, d.d. 01-04-2022				x		x		x	
15	Reactie vergunninghouder op vragen CCD				x		x		x	
16	Projectvoorstel na CCD advies				x				x	
17	Bijlage dierproeven na CCD advies				x				x	
18	Adviesnota aan CCD, d.d. 08-04-2022				x		x		x	x
19	NTS definitief			x						
20	Beschikking d.d. 08-04-2022				x		x		x	
21	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectaanvraag, d.d. 12-04-2022				x		x		x	



## 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 neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1

### Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	5.1 lid2h
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel 5.1 lid2e Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h
		Postcode en plaats	5.1 lid2h
		Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h

	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
	E-mailadres	5.1 lid2e	
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h
		Telefoonnummer	5.1 lid2e
		E-mailadres	5.1 lid2e
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	5.1 lid2h
		E-mailadres	5.1 lid2h
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een wijziging op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum: 01 - 03 - 2022 Einddatum (t/m): 28 - 02 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Stamceltherapie voor de behandeling van hersenschade bij te vroeg geboren baby's
3.4		Naam DEC: 5.1 lid2h Postadres: 5.1 lid2h

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

## 4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaat	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

--

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven 1

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

17-02-2022

Handtekening

5.1 lid2e



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene

#### gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Preterm birth, stated as birth at a gestational age under 37 weeks, is the most important cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries. Of all children born in the Netherlands, more than 7% are preterm. Advances in perinatal medicine, including improvements in respiratory support, resulted in in the

fact that even the sickest and smallest babies nowadays often survive. However, surviving preterm infants are at increased risk for life-long neurological disorders, collectively termed Encephalopathy of Prematurity (EoP), for which currently **no therapy** is available.

Over the past decade, many epidemiological and preclinical studies of preterm born infants and EoP have identified two antenatal (prenatal) factors that are almost always linked with the severity of EoP: exposure to infection/inflammation (chorioamnionitis) or hypoxia-ischemia (HI) [1-4]. The current proposal will specifically focus on antenatal infection/inflammation as etiological factor for preterm brain injury.

### **Antenatal infection/inflammation**

Chorioamnionitis (i.e. antenatal infection/inflammation) is defined as inflammation of the fetal membranes (chorion and amnion). When the fetus is directly exposed to intrauterine inflammation/infection via direct skin contact or swallowing and breathing movements in utero, the fetal immune system responds with release of pro-inflammatory cytokines that induce a fetal inflammatory response syndrome (FIRS).

Preterm neonates born with FIRS show a higher prevalence of prematurity-associated complications such as, respiratory distress syndrome, sepsis, bronchopulmonary dysplasia, periventricular leukomalacia (PVL), cerebral palsy (CP) and death [5]. Of these, brain injury (PVL, CP) is the biggest contributor to mortality and morbidity in these preterm infants [6, 7]. In fact, preterm infants exposed to FIRS have a risk of developing CP or PVL, that is 1.5 - 3-fold higher compared with unexposed preterm infants [8].

Although chorioamnionitis is an independent risk factor for preterm brain injury [9], in the vast majority of preterm infants, brain injury is caused by accumulation of **multiple perinatal and postnatal inflammatory triggers** comprising antenatal inflammation (i.e. chorioamnionitis) and postnatal injurious triggers such as mechanical ventilation. Whilst this respiratory assistance is essential for survival, ventilation increases the risk and incidence of brain injury [10]. These perinatal and postnatal inflammatory triggers cause a self-perpetuating cycle of peripheral and cerebral inflammation, primarily mediated by activation of microglia, the resident innate immune cells (i.e. macrophages) of the brain. Under physiological circumstances microglia play a central role in synaptic transmission and myelin maintenance. However, upon activation, microglia switch from a trophic/regenerative state to a pro-inflammatory phenotype mediating death and/or maturation blockade of oligodendrocytes. Loss of oligodendrocytes causes myelination defects and subsequent changes in cortical microstructure and connectivity leading to EoP [1, 11-14].

### **Therapy**

Following birth, all preterm infants receive supportive care, including adequate respiratory support, blood pressure support, normalization of fluid-electrolyte balance, and blood glucose levels, and, if necessary, antibiotic treatment, and treatment of seizures. Preterm brain injury evolves over time in a period of hours to weeks, creating a window of opportunity for treatment. However, therapeutic options to improve the outcomes of preterm neonates suffering from brain injury are lacking [1, 15].

Given the dominant role of inflammation in the induction of preterm brain injury, we consider that immune-modulatory interventions have a high potential to support recovery from brain injury in vulnerable neonates. Immune modulation can be directly effective or indirectly by improving the efficacy of other therapies.

### **Stem cells**

Cell-based interventions as a therapeutic strategy for injury to the (neonatal) central nervous system have gathered much attention in the past decade [16-24]. Many different types of stem cells, derived from fetal, placental, and adult tissues are currently under investigation [25-30]. Stromal cells, including mesenchymal stem cells (MSCs), have been a particular focus of research as they are easily obtainable (i.e. from cord blood, Wharton's jelly, bone marrow) and do not have the ethical and safety concerns of embryonic stem cells [21, 24]. Moreover, they lack of expression of MHC class II antigens, allowing their use for allogenic therapy [24]. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) has mainly been attributed to their immune-modulatory and regenerative potential [21, 22, 27, 31]. The effects of MSC on the immune system comprise both modulation of innate and adaptive immune responses from a

pro-inflammatory status towards an anti-inflammatory status, thereby reducing tissue injury and creating an environment in favor of tissue repair and regeneration [27, 28, 32].

Besides immune modulation in favor of regeneration, MSCs directly affect the injured central nervous system through secretion of neurotrophic factors that stimulate and maintain neurogenesis of the endogenous neuronal stem cell population and its subsequent differentiation into neuronal and oligodendroglial lineages [22, 27, 31, 33-35].

The neuroprotective potential of systemic stromal cell therapy was shown by our group in a preclinical preterm ovine model of global hypoxia-ischemia-induced injury [36-39]. MSC administration during the latent phase following global HI resulted in functional improvement and prevented hypomyelination of the subcortical white matter at 7 days post HI. These protective effects were attributed to anti-inflammatory effects since neuroinflammation and peripheral immune activation were significantly reduced [36, 37]. Specifically, intravenous MSC treatment reduced the proliferative capacity of splenic T lymphocytes with concomitant reduced cerebral T cell infiltration. In addition, systemic stromal cell therapy ameliorated splenic involution caused by global HI, implicating a key role of the spleen in the protective mechanisms of stem cell therapy.

There is increasing evidence for the effectiveness of stem cell administration via the intranasal route (IN) route, which is a feasible route for pharmacological treatment of neonates. This concept of IN administration is based on passage of stem cells over the cribiform plate along the olfactory nerve allowing for rapid dispersion throughout the brain, where local effects can be exerted [40-45]. In a study by van Velthoven et al. delayed (10 days post HI injury) IN administration of MSC therapy improved neurological outcomes 28 days post HI. These improved outcomes following IN administration were attributed to the regenerative potential of MSCs rather than inhibition of injurious (e.g. inflammatory) processes or prevention of injury since cells were administered when injury was readily established [44]. In fetal sheep, delayed intravenous stem cell administration 5 days after global HI was less effective than acute (early) administration 12 hours after reperfusion [46]. Efficacy of early MSC administration was attributed to systemic and neuro-immunomodulatory effects [46].

Although the pathophysiology leading to brain injury in preterm infants between HI and antenatal infection/inflammation show substantial overlap in terms of a systemic immune response towards the brain, there are discrepancies, mostly in temporal evolution/timing of injury, that inhibit translation of findings in HI models to the situation of antenatal infection/inflammation (chorioamnionitis). The critical role of timing was recently confirmed and explored in an LPS kinetics study by our group. In this study, we found that intra-amniotic exposure to LPS induced systemic within 12 h after LPS exposure, followed by neuroinflammatory response at 48 hours post LPS exposure. Interestingly, white matter injury in following antenatal LPS exposure was not detected until 15 days post-LPS exposure [46], whereas white matter injury following global HI was readily visible at 7 days post HI [11, 12, 38]

Collectively, administration route in relation to timing of administration appears to be crucial for the action of MSCs (immune modulation and regeneration) to establish optimal neuroprotection. As such, repeated dosing by different administration routes throughout different phases disease progression might ultimately lead to the greatest benefit.

In the current project we will test the therapeutic effect of early intravenous (IV), delayed intranasal (IN) or combined early IV and delayed IN administration in a translational ovine model of perinatal inflammatory stress-induced EoP

## References:

1. Ophelders, D.R.M.G., *et al.*, *Cells*, 2020. **9**(8): p. 1871.
2. Leviton, A., *et al.*, *Early human development*, 2016. **93**: p. 25-32.
3. Volpe, J.J., *Semin Pediatr Neurol*, 2009. **16**(4): p. 167-78.
4. Volpe, J.J.T.L.N., 2009. **8**(1): p. 110-124.
5. Wolfsberger, C.H., *et al.*, *Frontiers in pediatrics*, 2020. **8**: p. 401.
6. Goldenberg, R.L., *et al.*, *The Lancet*, 2008. **371**(9606): p. 75-84.
7. Tronnes, H., *et al.*, *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2014. **56**(8): p. 779-85.
8. Reiss, J.D., *et al.*, *Experimental Neurology*, 2022: p. 113988.

9. Gotsch, F., *et al.*, Clinical obstetrics and gynecology, 2007. **50**(3): p. 652-683.
10. Barton, S.K., *et al.*, Neonatology, 2016. **110**(2): p. 155-162.
11. Hagberg, H., *et al.*, Nature Reviews Neurology, 2015. **11**(4): p. 192-208.
12. Jellema, R.K., *et al.*, PLoS one, 2013. **8**(8): p. e73031.
13. Jellema, R.K., *et al.*, Journal of neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 241.
14. Ophelders, D.R., *et al.*, Journal of neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 29.
15. Van Bel, F., *et al.*, Frontiers in physiology, 2019. **10**: p. 181.
16. Bennet, L., *et al.*, Annals of neurology, 2012. **71**(5): p. 589-600.
17. Tomanlio, L., *et al.*, Annals of neurology, 2011. **70**(5): p. 698-712.
18. van Velthoven, C.T., *et al.*, Brain research reviews, 2009. **61**(1): p. 1-13.
19. Gortner, L., *et al.*, Klinische Pädiatrie, 2012. **224**(4): p. 233.
20. Borlongan, C.V., *et al.*, Pediatric research, 2011. **70**(1): p. 3-9.
21. Donega, V., *et al.*, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2013. **33**(5): p. 625-634.
22. van Velthoven, C.T., *et al.*, Pediatric research, 2012. **71**(4-2): p. 474-481.
23. Dalous, J., *et al.*, Stem cells and development, 2012. **22**(1): p. 169-179.
24. Fleiss, B., *et al.*, Clinics in perinatology, 2014. **41**(1): p. 133-148.
25. Jiang, Y., *et al.*, Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-49.
26. Méndez-Ferrer, S., *et al.*, nature, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
27. Uccelli, A., *et al.*, Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(9): p. 726-736.
28. Le Blanc, K., *et al.*, Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(5): p. 383-396.
29. Bieback, K., *et al.*, Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2008. **35**(4): p. 286-294.
30. Portmann-Lanz, C.B., *et al.*, American journal of obstetrics and gynecology, 2006. **194**(3): p. 664-673.
31. Uccelli, A., *et al.*, Best practice & research Clinical haematology, 2011. **24**(1): p. 59-64.
32. Siegel, G., *et al.*, Transplantation, 2009. **87**(9S): p. S45-S49.
33. van Velthoven, C.T., *et al.*, The Journal of Neuroscience, 2010. **30**(28): p. 9603-9611.
34. Rivera, F.J., *et al.*, Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2209-2219.
35. Steffenhagen, C., *et al.*, Stem cells and development, 2011. **21**(11): p. 1838-1851.
36. Jellema, R.K., *et al.*, PLoS ONE, 2013. **8**(8): p. e73031.
37. Jellema, R.K., *et al.*, Journal of neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 1-14.
38. Gussenhoven, R., *et al.*, Stem cells translational medicine, 2021. **10**(1): p. 57-67.
39. Ophelders, D.R., *et al.*, 2016. **5**(6): p. 754-763.
40. Donega, V., *et al.*, Experimental neurology, 2014. **261**: p. 53-64.
41. Donega, V., *et al.*, PLoS one, 2013. **8**(1).
42. Wagenaar, N., *et al.*, Dev Med Child Neurol, 2017. **59**(10): p. 997-1003.
43. van den Heuvel, L.G., *et al.*, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2019. **39**(2): p. 223-239.
44. Van Velthoven, C.T., *et al.*, Pediatric research, 2010. **68**(5): p. 419-422.
45. Oppliger, B., *et al.*, Stem cells and development, 2016. **25**(16): p. 1234-1242.
46. Li, J., *et al.*, Experimental neurology, 2016. **283**: p. 179-187.
47. Blencowe, H., *et al.*, Reprod Health, 2013. **10** Suppl 1: p. S2.
48. Cannavò, L., *et al.*, Italian Journal of Pediatrics, 2020. **46**(1): p. 1-5.
49. Boswinkel, V., *et al.*, European Journal of Radiology, 2021. **136**: p. 109500.

## 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

The main goal of this project is to validate the neuroprotective potential of two SC-treatment paradigms, being early intravenous (IV) and delayed intranasal (IN) *in vivo* a preclinical ovine model of EoP caused by perinatal inflammatory stress, comprising antenatal infection/inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation.

For this purpose, we have the following research objectives:



The specific objectives are:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess the long-term neuroprotective potential of SC delivery in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
  - a. To longitudinally assess therapeutic efficacy of 'early' IV SC treatment
  - b. To longitudinally assess therapeutic efficacy of 'delayed' IN SC treatment
  - c. To longitudinally assess therapeutic efficacy of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

The proposed objectives are achievable as we use well-established models that are currently still in use. The laboratory of Pediatrics of [5.1 lid2h](#) has a lot of experience with ventilated preterm lambs has set up a unique infrastructure in which we successfully perform long-term survival studies in preterm lambs.

Moreover, the laboratory of Pediatrics has extensive experience with stem cell applications in ovine models [12, 13, 38, 39]. Moreover, the infrastructure and protocols necessary for such stem cell trials are readily available.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

## 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Worldwide, 15 million babies are born preterm every year, of which 400.000 are born in the EU and 12.000 in the Netherlands [47]. In 2010, the Global Burden of Disease Study estimated that preterm birth was the commonest cause of death and disability in children under the age of 5 years. We are fortunate that most of these infants survive, but morbidity is very high, predominantly due to neurological damage. Compared to infants born at term, preterm babies have an increased risk of acute and chronic brain injuries such as cognitive deficits and behavioral (40–50%) and cerebral palsy (5–10%) [48]. Currently, treatments to repair the brain damage of EoP are limited [1, 15].

The severity of this neurological injury is highlighted by the fact that in a high healthcare setting more than 50% of babies born before 28 weeks ('extreme preterm') and about 30% of babies born between 28 and 32 weeks ('very preterm') will suffer lifelong disability, including cerebral palsy (CP), severely impaired cognitive functions, and psychiatric disorders such as attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorders (ASD). Even those babies born between 32 and 37 weeks (i.e., 'moderate to late preterm') are at increased risk of neonatal mortality and morbidity, including increased rates of CP and lower cognitive performance on standardized IQ exams [49]. As such, prematurity is a significant problem for the provision of long-term educational and health care.

This project aims to validate SCs as a regenerative therapy for EoP to improve the quality of life for these infants and reduce the societal costs of their special needs.

In addition, assessment of bio-distribution in relation to efficacy and cell fate will provide novel and essential mechanistic insight, which will contribute to improve existing treatment paradigms, identify novel therapeutic targets and provide essential data on safety of cell-administration.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

This project has several stakeholders:

- In this project we will use animals to investigate the proposed research questions. The animals will undergo procedures that will cause discomfort. As such, this makes them an important stakeholder in this project. With the available expertise of our research group and novel insight that are gained during this project, we will limit the degree of discomfort. Reduction of discomfort is in the best interest of the animal and will also lead to reliable data.
- Future infants with EoP and their families, caregivers will benefit from this project. EoP is still an unmet clinical need. The results from this project will form the scientific basis for follow-up studies and (ultimately) well-designed clinical trials in which infants will be enrolled.
- Other researchers, such as developmental neuroscientists, stem cell biologists, molecular biologists, immunologists, bioinformaticians, and engineering scientists are involved in data acquisition and interpretation.  
They will present data in peer-reviewed papers, theses, and conferences.
- Specialists from the following clinical departments are involved in this study through active input, optimization and execution of specific assessments and data processing: Pediatrics/neonatology, child neurology, pediatric radiology and clinical physics, movement sciences, orthopedics, pediatric nephrology, clinical immunology.  
Active participation of clinical partners is essential for clinical translation of our findings.
- Pharmaceutical partner. The SCs will be provided by a pharmaceutical partner. They are not involved in the actual animal experiments and are not involved in data interpretation or publication of results. However, they benefit from our results and insights as these will aid in further development of the cell product, not only for the clinical indication of EoP, but also others.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

This project is part of a H2020 consortium that aims to validate umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells (H-MSCs) as a regenerative therapy for preterm brain injury, which will form the basis of well-designed clinical trials.

#### ***Preparatory studies:***

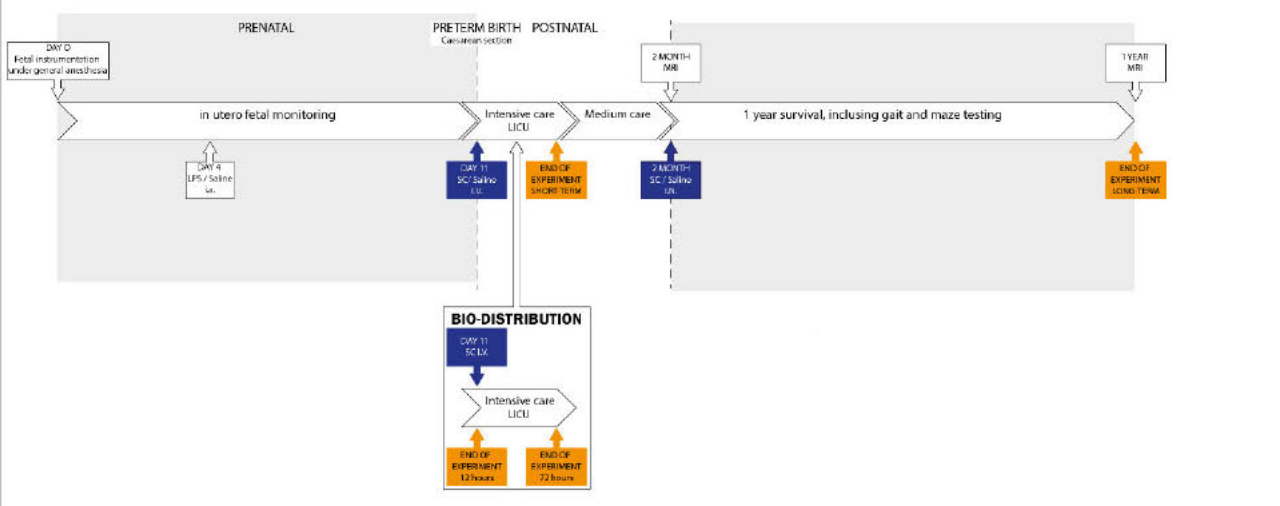
Based on input generated in small animal models by consortium partners on the regenerative abilities of various doses with respect to timing and route of administration of SCs, we will test the most 'promising' dose in our preclinical ovine model of preterm brain injury. Establishment of the most promising dose will be a milestone and will serve as a GO-moment to start with the ovine studies. In previous studies, we already showed that SCs of various sources have therapeutic efficacy without adverse reactions, thereby demonstrating compatibility of SCs in our model(s).

The sheep model closely resembles the human developmental biology in terms of similar fetal and neonatal development of the brain, other organs and the immune system. Moreover, the size of the animal allows fetal instrumentation, inducing antenatal inflammation and neonatal care according to clinical standards. In line with these strong assets, the sheep model has an impressive track record of clinical translation of important therapeutic interventions in neonatal medicine (e.g., therapeutic hypothermia for neonatal HIE, maternal corticosteroids for fetal lung maturation and surfactant replacement therapy for respiratory distress syndrome) and basic understanding of fetal and neonatal physiology. Therefore, this is one of the most suitable animal models to validate new therapeutic strategies in neonatal medicine.

### Ovine studies:

For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours.

For assessment of short-term efficacy, lambs will be euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment (figure 1). Depending on the experimental group, lambs will receive postnatal SCs according to a pre-defined paradigm.



**Figure 1 Experimental design.** For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. Stem cells will be administered at 4 hours after preterm birth (intravenous (IV)) and/or intranasal (IN) at 2 months. For assessment of short-term efficacy, lambs are humanely euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment. For bio-distribution will be studies at 12 hours and 72 hours after IV administration.

We will investigate short- and long-term therapeutic efficacy of treatment paradigms based on input generated from a matrix performed in rodents. These rodent studies are not part of this project. In addition, we will investigate short-and long-term bio-distribution and cell fate of the pre-defined treatment paradigms.

A major milestone we already accomplished for this project is that the models we use (both long- and short-term) are successfully up and running.

We will explore the protective potential of SCs on the structural and functional outcome of the preterm brain in our ovine model. Since development of EoP finds its origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation), that cause a self-perpetuating cycle of systemic and cerebral inflammation, we will administer SCs intravenous (IV) immediately after preterm birth. With the IV dose, we want to investigate (in the circulation) the effects of perinatal stress on neurodevelopmental and immunological outcome during the transition from fetus into childhood till adulthood.

Perinatal stress is associated with direct neurodevelopmental injuries (such as seizures), with potential life-long consequences, such as cognitive and movement impairments. Consequently, such latter consequences can only be proven at in later life (1 year in sheep). Therefore, the therapeutic effects will be studied during early postnatal life (**objective 1**) and at adulthood in comparison to term born reference lambs to correct for possible long-term effects of preterm birth alone (**objective 2**). Moreover, short-term

assessment will provide essential mechanistic insights in to further clarify the working mechanism of the IV administered stem cells.

Although early targeting of inflammatory processes leading to EoP with IV administration might be an effective strategy, it remains to be clarified that this therapeutic effect is permanent or that a proportion of neonates might still develop a form of structural brain injury with life-long functional consequences. In these infants, a second dose of IN stem cells, at 2 months when structural injury is clinically evident, will potentially boost endogenous regeneration and prevent or diminish further functional disability in later life. However, IN stem cell therapy, or combined IV and IN stem cells therapy can only be assess in a long-term cohort.

In this project we will start with **objectives 1 and 3**, being short-term neuroprotective potential of IV administered SCs and cell tracing, followed by longitudinally assessment of the long-term neuroprotective potential SC delivery (**objective 2**).

Cell tracing (**objective 3**) will be studied at 12 hours and at 72 hours. We will assess bio-distribution at 12 hours since the administered cells are still viable at this time point and we can assess the location where these cells have migrated to and will exert their function. Assessment of bio-distribution at 72 hours post administration will provide mechanistic insight in the stem cell fate and on the interaction between the stem cells and their micro-environment (eg. other cells).

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

##### **Short- and long-term survival:**

Development of EoP seems to originate in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of SCs in the context of these factors. Importantly, neurodevelopmental complications can emerge at different stages throughout life, including during adolescence or young-adulthood. Consequently, we aim to investigate the effects of SC therapy in early life and at adulthood. We will start with the short-term and cell tracing experiments followed by long-term survival studies. Short-term and tracing studies will be done simultaneously as some of the animals are labeled for both studies and all experimental procedures are identical.

Long-term studies are not dependent on the results of the short-term studies since effects of perinatal inflammatory stress with and without SC treatment often become visible at later stages in life, whereas cellular/molecular changes that serve as the basis for these effects might be (transiently) present at an early stage.

##### **Cell tracing:**

Cell tracing (**objective 3**) will be studied at 12 hours and at 72 hours following IV administration. We will assess bio-distribution at 12 hours since the administered cells are still viable at this time point and we can assess the location where these cells have migrated to and will exert their function. Assessment of bio-distribution at 72 hours post administration will provide mechanistic insight in the stem cell fate and on the interaction between the stem cells and their micro-environment (eg. other cells).

Cell tracing will only be performed on the IV administered SCs since IN administration is performed at 2 months post preterm birth and molecular outcomes are assessed at 1 year. Due to the size of the animal (>40kg at 1 year), the discriminative power of our laboratory technique is too little to reliably detect cells.

#### 3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Perinatal inflammation with postnatal survival
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummva | Titel dierproef                                |
|------------|------------------------------------------------|
| 1          | Perinatal inflammation with postnatal survival |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

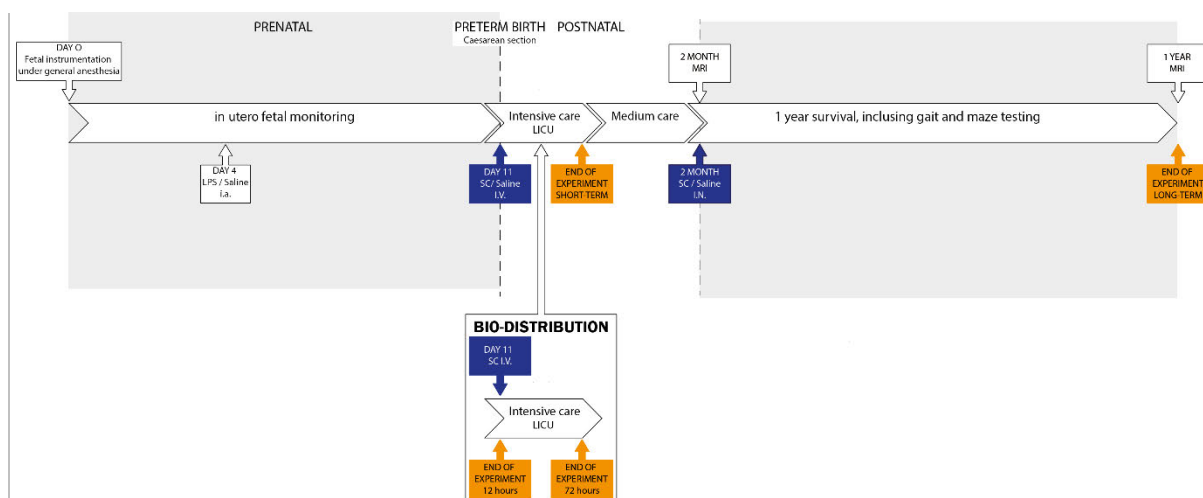
The main goal of this project is to validate the neuroprotective potential of two SC-treatment paradigms, being early intravenous (IV) and delayed intranasal (IN) in vivo a preclinical ovine model of EoP caused by perinatal inflammatory stress, comprising antenatal infection/inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation.

For this purpose, we have the following research objectives:

The specific objectives are:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess the long-term neuroprotective potential of SC delivery in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
  - a. To longitudinally assess therapeutic efficacy of 'early' IV SC treatment
  - b. To longitudinally assess therapeutic efficacy of 'delayed' IN SC treatment
  - c. To longitudinally assess therapeutic efficacy of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

We will investigate these objectives in a translational ovine model of perinatal inflammatory stress, comprising antenatal inflammation, and postnatal mechanical ventilation (figure 1).



**Figure 1 Experimental design.** For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. Stem cells will be administered at 4 hours after preterm birth (intravenous (IV)) and/or intranasal (IN) at 2 months. For assessment of short-term efficacy, lambs are humanely euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term survival, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment. For bio-distribution will be studies at 12 hours and 72 hours after IV administration.

For assessment of short-term efficacy, lambs will be euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment.

For cell tracing experiments lambs will be euthanized 12 hours and 72 hours after SCs administration.

### Neurodevelopmental outcomes:

#### Short-term:

Functional/behavioral: amplitude-integrated (a)EEG, MRI, Sleep-wake cycles, ultrafast Doppler ultrasound  
 Structural: histology (white matter injury and neuroinflammation), MRI, ultrasound  
 Molecular: microglia, astrocytes, CSF

#### Long-term:

Functional/behavioral: aEEG, MRI, Sleep-wake cycles, ultrafast Doppler ultrasound, gait analysis, maze testing  
 Structural: histology (white matter injury and neuroinflammation), MRI, ultrasound  
 Molecular: microglia, astrocytes, CSF

Our **primary neurodevelopmental outcome** parameters are neuroinflammation and white matter injury. Besides assessment of neurodevelopment, we will also assess pulmonary development/function, renal development/function, cardiovascular development/function, intestinal development/function.

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

### **Fetal instrumentation and antenatal inflammation**

For this project, pregnant ewes with singleton fetuses (119-121 dGA, term is ~147 days) will undergo fetal instrumentation under general anesthesia. Previous experiments in the Pediatrics lab have proven feasibility and reliability of this operation method with minimal fetal or maternal losses (1). During instrumentation fetuses are exposed via a maternal laparotomy and hysterotomy. After exposure, the fetuses are equipped with arterial and venous catheters and a catheter in the amniotic cavity. Following placement of the catheters, the uterus and maternal abdomen are closed and all catheters are exteriorized via a trocar hole in the maternal flank. These catheters enable fetal monitoring (blood gas), blood sampling to assess their inflammatory status and the amniotic line allows for administration of lipopolysaccharide (LPS).

For the long-term studies, no vascular catheters will be placed as these impair postnatal survival since they need to be surgically removed and there is a risk of hind leg ischemia/hypoperfusion due to obstruction of arterial perfusion.

After a recovery period, fetuses will be exposed to antenatal inflammation induced by intra-amniotic (antenatal) LPS exposure at 125 dGA.

### **Postnatal survival and neonatal care**

Seven days after induction of antenatal inflammation, the lambs are born preterm via Caesarean section, intubated, and transferred to the Lamb Intensive Care Unit (LICU) where they receive intensive neonatal care including mechanical ventilation. Immediately after preterm birth, the ewe is euthanized while under general anesthesia. The maturational age was chosen due to relative lung and brain immaturity, sensitivity to perinatal inflammatory stress including antenatal LPS exposure and ventilator injury.

In case of the long-term animals, vascular catheters will be placed during Caesarean section in the umbilical vessels or hind leg (modified EXIT-procedure). Surfactant replacement therapy will be started immediately to maintain proper gas exchange and continued until the fetus/lamb does not depend on exogenous surfactant to maintain sufficient gas exchange. Parenteral feeding will start immediately after birth according to clinical guidelines and will be supplemented with enteral feeding of colostrum within 6 hours after birth. Vital parameters, incl. blood pressure, oxygen saturation, temperature, ECG and EEG are monitored continuously. Ventilation parameters (FiO<sub>2</sub> and frequency) are continuously adjusted based on arterial blood gas analysis and pulse oximetry. After 72 hours, the short-term animals are euthanized and organs and tissues will be collected for laboratory analyses. At 4-6 hours postnatal lambs will receive an IV bolus of SCs or an equal volume of sterile saline. This IV dose is aimed at modulation of the peripheral inflammatory/immune response, which is at the center of the pathophysiology of perinatal inflammatory stress-induced EoP (2).

### **Long term survival**

For the long-term follow-up, animals will be weaned of ventilator support according to established protocols. As soon as the lambs are independent of respiratory support, we will start our protocol for motherless rearing for as long as needed. In house care is provided until the lambs are able to be kept in the meadow. Blood samples will be taken during survival (max 1 blood draw per month).

At two months animals will receive a 'delayed' intranasal (IN) dose of SCs or an equal volume of sterile saline (also IN). With this (delayed) IN dose the SCs will migrate into the damaged brain and act as a biologically responsive source of growth factors (3, 4).

Neurodevelopment will be monitored longitudinally at 2 months after preterm birth and at the end of the experiment (1 year) with MRI and EEG. In addition, functional neurodevelopment will be assessed at 8 and 12 months with gait analysis and maze testing.

For term reference controls, lambs are born at term and reared by the ewe. These lambs do not require ventilator support. These lambs will undergo identical experimental assessment procedures, including monthly blood sampling, MRI, aEEG, gait analysis, and maze testing and will serve as controls for the (adverse) effects of preterm birth.

For cell-tracing experiments, SCs will be equipped with multimodal nanoparticles. These nanoparticles enable ex vivo quantification and visualization of cells in a tissues and blood.



For the **short-term postnatal survival** this results in 4 groups:

1. Control – sham treatment (n=11)
2. Control – Stem cells IV (n=11)
3. LPS – sham treatment (n=11)
4. LPS – Stem cells IV (n=11)

For the **cell tracing experiments** this results in the following groups:

1. Control – Stem cells IV 'early' sacrifice @12 hours (n=10)
2. LPS – Stem cells IV 'early' sacrifice @12 hours (n=10)
3. Control – Stem cells IV 'early' sacrifice @72 hours (n=11)
4. LPS – Stem cells IV 'early' sacrifice @72 hours (n=11)

We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 22 animals.

For the **long-term postnatal survival** this results in 9 groups:

1. Control – sham treatment (n=12)
2. Control – Stem cells IV 'early' (n=12)
3. Control – Stem cells IN 'delayed' (n=12)
4. Control – Stem cells IV 'early' & IN 'delayed' (n=12)
5. LPS – sham treatment (n=13)
6. LPS – Stem cells IV 'early' (n=13)
7. LPS – Stem cells IN 'delayed' (n=13)
8. LPS – Stem cells IV 'early' & IN 'delayed' (n=13)
9. Term born reference controls (n=12)

1. Nikiforou M, Vanderlocht J, Chougnet CA, Jellema RK, Ophelders DR, Joosten M, et al. Prophylactic Interleukin-2 Treatment Prevents Fetal Gut Inflammation and Injury in an Ovine Model of Chorioamnionitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(9):2026-38.
2. Ophelders DRMG, Gussenhoven R, Klein L, Jellema RK, Westerlaken RJJ, Hütten MC, et al. Preterm Brain Injury, Antenatal Triggers, and Therapeutics: Timing Is Key. *Cells*. 2020;9(8):1871.
3. Oppliger B, Joerger-Messerli M, Mueller M, Reinhart U, Schneider P, Surbek DV, et al. Intranasal delivery of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells preserves myelination in perinatal brain damage. *Stem cells and development*. 2016;25(16):1234-42.
4. Thomi G, Surbek D, Haesler V, Joerger-Messerli M, Schoeberlein A. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-16.
5. Wolfs TG, Jellema RK, Turrisi G, Becucci E, Buonocore G, Kramer BW. Inflammation-induced immune suppression of the fetus: a potential link between chorioamnionitis and postnatal early onset sepsis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2012;25(sup1):8-11.

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

#### **Group sizes and statistics:**

Group sizes were calculated with G\*power. Based on previous (unpublished) sheep work, we detected an effect size of  $F=0.51$  for the number of cells/mm<sup>2</sup> that stained for microglial markers IBA-1 (measure for neuroinflammation) between controls, LPS exposed and SC treated animals. Based on these data and assuming an ANOVA setting, with a power of 80%, and  $\alpha=0.05$  (two-sided) for 4 experimental groups we anticipate requiring 9 fetuses/group x 4 groups. Based on dropout rates for the short-term animals of 20%, we request 11 pregnant sheep and fetuses per group and **44** in total.

In the long-term experiments we have a 30% drop-out rate in non-exposed (sham, no LPS exposure) groups and a dropout rate of 35% for LPS exposed animals. Drop-out rates in the LPS-exposed groups are higher

compared to non-exposed groups as these animals are more prone to (lethal) infections and require prolonged respiratory support (unpublished findings).

As such, we anticipate requiring **12** pregnant sheep and fetuses per group in the non-exposed and term born reference groups and **13** pregnant sheep and fetuses in the LPS-exposed groups.

We estimate that for the cell tracing experiments **20** ewes and fetuses are required. Similar to the short-term animals these lambs will undergo fetal instrumentation. However, the risk for dropout is lower in the animals that are planned to for 12 hours (10%) ventilation when compared to 72 hours ventilation (20%). We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 22 animals.

Collectively, we will need a total of **176 pregnant ewes and 176 fetuses/lambs (total 352 sheep)**.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Sheep	Breeder	Pregnant ewe	176	Female	n/a	n/a
2	Sheep	Breeder	>2/3 gestation	176	Male and Female	n/a	n/a

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	We have chosen Texel sheep for these experiments since ovine fetal development, in terms of white matter myelination, lung alveolarization and intestinal crypt formation, is comparable to human fetal development: both processes start prenatally and continue postnatally, whereas these processes start postnatally in rodents (5). Moreover, the size of the ovine fetus/lamb allows for chronic <i>in utero</i> instrumentation and allows the use of ventilation equipment and ventilation strategies currently used in clinical practice. Furthermore, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes for most organs. Important, therapies that are now the golden standard in human neonatal care, such as antenatal steroids, surfactant replacement therapy and neonatal cooling were developed in preterm lambs.
Herkomst	Our sheep are purchased from a Texel sheep breeder, contracted by <a href="#">5.1 lid2h</a> that is able to perform time-mated breeding.
Levensstadia	Pregnant ewes with singleton fetuses (>2/3 of gestation). Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate <i>in utero</i> growth before transport to the animal facility.
Aantal	176 ewes and 176 fetuses
Geslacht	We will use pregnant ewes (female) and fetuses/lambs of both genders
Genetisch gewijzigd	n/a
Stam	n/a

## C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

---

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

#### Ewe:

All surgical procedures will be performed under general anesthesia with analgesia (both systemically and locally) Analgesia will be continued after surgery for a minimum of 4 days. Welfare, including pain is assessed at least daily and additional analgesia is administered if needed and after consultation with a veterinarian.

#### Fetus/lamb:

##### In utero:

Whilst on placental circulation (during fetal instrumentation and first part of Caesarean section), the fetus/lamb is sedated through anesthesia of the ewe that crosses the placental barrier.

##### Postnatal:

Postnatally, the (non-sedated) lambs receive analgesia (intravenous) to reduce potential discomfort that arises from the endotracheal tube. After extubation, analgesia is discontinued. Moreover, vital parameters are continuously (24 hours/day) monitored on the lamb intensive care unit by skilled personnel trained to recognize discomfort or complications potentially leading to discomfort and act upon recognition to prevent (further) discomfort).

---

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

#### **For the ewes the following complications that influence well-being might arise:**

- Intra-uterine fetal death leading to abortion
- Abdominal hernia
- Post-operative infections
- Post-operative gastro-intestinal complications (reduced rumination or ileus) leading to a negative energy balance

#### **For all fetus/lambs (both short-term and long-term), the following complications might arise that influence well-being:**

- Pain
- Hemodynamic instability
- Respiratory complications (pneumothorax, hypoxia, acidosis)
- Hypoglycemia
- Malnourishment
- Infection (systemic and local)
- Gastro-intestinal complications (diarrhea, infection)

#### **For lambs that are planned for long-term survival, the following complications might arise in addition to the aforementioned complications:**

- Urinary calculi
- Arthritis
- Shortness of breath

---

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ewe:

---

- Abortion might occur due to fetal death caused by fetal instrumentation and/or intrauterine infection. However, this is uncommon in this species, and therefore, a major reason to use this species;
- All ewes undergo laparotomy that needs to be closed with sutures. In case pressure on the wound increases due to rumination (coughing up food) there is a risk that the tissue around the suture entrance point of the suture itself tears. This will result in a permanent 'hole' (hernia) in the abdominal wall through which the intestines might herniate leading to severe intestinal ischemia, pain and death.
- Although the ewes are operated on aseptically, they have a permanent wound in their flank through which the catheters are exteriorized. This wound will might serve as an entrance point for infectious organisms that persists until the Caesarean section and is a possible risk for infection.
- Due to abdominal surgery or postoperative pain, motility of the maternal intestines might temporarily be reduced or completely absent. This might lead to an intestinal obstruction, reduced food intake and absorption leading to a negative energy balance for the pregnant ewe with potential lethal consequences, also for the fetus.

#### Fetus/lamb:

- Pain might occur due to increased oxygen need during mechanical ventilation, or due to invasive procedures.
- Respiratory complications (pneumothorax, hypoxia, and acidosis) might occur to immaturity of the respiratory system.
- Hemodynamic instability might occur due to an underdeveloped cardiovascular and respiratory system.'
- Preterm lambs are naturally sensitive for infection due to an underdeveloped immune system. These lambs are equipped with arterial and venous catheters that are potential entrance points for infectious microorganisms into the circulation.
- Entrance points of vascular catheters (porte d'entree) in the lambs might become infected by environmental microorganisms.
- Hypoglycemia might occur due to increased glucose need during ventilation.
- Malnourishment might occur due to motherless rearing and reduced oral intake.
- Gastro-intestinal complications might occur due to prematurity and malnourishment.
- Urinary calculi might form due to (1) underdeveloped renal calcium excretion system due to prematurity often in combination with a urinary tract infection and a mineral dysbalance. These calculi can permanently obstruct the urethra, preventing the lamb to urinate and leading to an overfilled bladder and pain. This complication especially arises in male lambs as they have a sigmoid flexure in the urethra.
- Arthritis in sheep is caused by a bacterial infection of the joints. It usually occurs in young sheep when bacteria localize in the joints after entering the body through the umbilical cord.
- Shortness of breath is predominantly causes by inadequate removal of mucus since the lambs might not be able to cough up mucus. This, in combination with a high work of breathing (retractions and high breathing frequency) that all preterm lambs have in the first weeks, might cause the lambs to become hypoxic.

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

#### Ewe:

- Abortion by itself cannot be prevented. However, recognition of intra-uterine fetal demise and/or pending preterm labor will prevent additional discomfort. Depending on the experimental set-up (need for fetal instrumentation) *in utero* fetal well-being will be checked by daily blood gas analysis. Our staff is trained to recognize symptoms of pending labor. Fetal demise and/or pending preterm labor are described as human endpoints.
- Abdominal hernia is prevented by the use of a double loop suture that is especially suitable in cases where extended wound support and strength are required.
- Infection will be prevented by aseptic procedures during surgery combined with the use of antibiotics and proper wound care (i.e. antimicrobial spray on wounds).
- Reduced motility is prevented by proper analgesia in combination. In addition, the ewes are not individually housed anymore as this prevented them from walking around. Walking is a strong stimulator of intestinal motility.

**Fetus/lamb:**

- During surgery, the fetus/lamb is anesthetized through the ewe and will receive analgesia via the ewe (medication crossed the placenta). During mechanical ventilation, **pain** will be targeted via intravenous administration of analgesia.
- Proper ventilation strategies and assessment of vital parameters (blood gas, blood pressure) will prevent adverse physiological reactions (acidosis). Surfactant replacement therapy (standard care) in combination with mechanical ventilation will prevent hypoxia. Pneumothorax will be defined as a humane endpoint.
- Hemodynamic instability will be controlled by transfusion of blood (from placenta) immediately after birth, intravenous infusion of saline combined with electrolytes, and if necessary inotropic agents.
- Adequate enteral and parenteral feeding strategies will prevent hypoglycemia, which is checked regularly in combination with blood gas analysis and other electrolytes.
- Infections are prevented by:
  - o aseptic surgical techniques
  - o strict hygiene and disinfection protocols during procedures and around vascular catheters
  - o prevention of cross contamination between animals
  - o personal hygiene measures
  - o daily cleaning and disinfection of the intensive care environment
  - o Prophylactic antibiotics
  - o Culture of vascular catheter line tips incl. antibiogram to ensure proper use of antibiotics, but also reduce the risk for resistance.
- Malnourishment will be prevented by continuous monitoring of 'eating behavior', manual feeding if necessary, and offering a varied diet. Proper feeding will also prevent postnatal gastro-intestinal complications.
- Formation of urinary calculi is prevented by ensuring adequate oral intake of fluids, especially water, infection prevention and a well-balance mineral intake (phosphorus and calcium) in the form of pellet food and hay grass. Regular assessment of urine sediment is performed to assess potential formation of calculi.
- Arthritis can be prevented by proper infection prevention. In addition, regular disinfection of the umbilical cord is important.
- Shortness of breath will be prevented by regular pulse oximetry measurements in combination with auscultation of the lungs. If the lambs is hypoxic, oxygen supplementation treatment can be applied in combination with nebulization of medicaments to (1) ease the work of breathing and (2) to tackle underlying causes such as mucus plugs.

**E. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

**Humane endpoints for ewes**

- Pending preterm labor
- Intra-uterine fetal death (checked by absence of fetal blood pressure, and blood pH<6.8)
- Sepsis/ infection not responding to treatment
  - o Local (at the site of catheter exit in flank): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
  - o Systemic: Combined and persistent signs of infection (elevation of the body-temperature plus tachypnea or high pulse plus impaired feeding), lethargy, excessive time lying down -> evaluation by researcher in consult with veterinarian
- Maternal metabolic problems (pregnancy toxemia). Insufficient intake of food can lead to decreased blood glucose levels and subsequent ketosis. Food intake and gastro-intestinal activity (rumination, rumen sounds, borborygme, and defecation) should be monitored daily. The cause of decreased food intake (e.g. post-operative pain) should be investigated with help of a veterinarian. If a ewe does not respond to

treatment of decrease blood glucose (IV glucose or Propylene glycol) and/or pain medication a HEP is reached.

- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)

Assessment of pain:

- o Lack of appetite
- o Grinding of teeth
- o Reluctance to stand/ excessive time lying down
- o Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort

#### **Humane endpoints for fetus (*in utero*)**

- Hypoxia-ischemia (decreased blood-pressure, decreased heart rate, decreased blood pH (<7.0), elevated blood CO<sub>2</sub>, decreased blood O<sub>2</sub> and saturation)
- Severe sepsis leading to hypotension and severe metabolic acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis.

#### **Humane endpoints for lamb (short-term postnatal and cell tracing)**

- Unsuccessful (re-)intubation mandating tracheotomy
  - o Intubation complicated by vocal cord spasms can lead to severe respiratory distress. In this case the lamb can be intubated by tracheotomy. However, tracheotomy in animals that are awake causes severe discomfort and therefore continuous sedation is needed that influences the outcome of the fetus. In addition, lambs that have undergone tracheotomy are not eligible for postnatal survival since the procedure of restoration of the tracheotomy causes severe discomfort.
- Pneumothorax:
  - o Blood gas analysis (pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>), saturation (pulse oximetry): these parameters are monitored and documented. Target ranges are defined to control ventilation and to identify need for surfactant re-dosing. Rapid changes indicate ventilation complications such as pneumothorax or atelectasis, which can be verified by auscultation, ultrasound or chest X-ray. Pneumothorax may be treated by means of a thorax drain. Pneumothorax can dramatically impair fetal well-being with continuous severe discomfort. Moreover, pneumothorax, regardless of treatment, is a confounder in the experiment that will critically influence experimental outcomes.
- Uncorrectable severe acidosis:
  - o Severe acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis which cannot be corrected by Sodium bicarbonate treatment is considered a HEP.
- Sepsis with uncorrectable hypovolemia
  - o Severe sepsis leading to hypotension (MAP < 20 mmHg) and severe acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis is a humane endpoint.
- Multi-organ failure

#### **Humane endpoints for lamb (long-term)**

- Congenital malformations that are not compatible with long-term survival (anatomical malformations, extreme low birth weight for GA (<60% of average weight for GA))
- Unsuccessful weaning of ventilator support
  - o FiO<sub>2</sub> > 0.50 at 72 hours of ventilation
  - o SaO<sub>2</sub> < 80% for more than 1 hour with a maximal flow of 15L/min and FiO<sub>2</sub> of 1.0
  - o Extubation failure after a third weaning attempt.
  - o Need for O<sub>2</sub> treatment of ventilator support 7 days after extubation.
- Untreatable Infection/inflammation:
  - o Local (e.g. after venipuncture): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
  - o Systemic: Combined and persistent signs of infection (elevation of the body-temperature plus tachypnea or high pulse plus impaired feeding), lethargy, excessive time lying down -> evaluation by researcher in consult with veterinarian
- Gastro-intestinal (untreatable bloat)

- Failure to thrive
  - o Insufficient weight gain with respect to size and body composition. Normal growth for term Texel lambs during suckling is 300 g/day. Due to prematurity, growth rates might be lower in our experiment. The lambs are weighed every day and measured weekly (crown-rump length) and growth curves will be made. If weight (gain) in relation to growth of the lamb stagnates or decreases >20% this will be a humane endpoint.
  - o Inability to independently reach food and water
- Urinary calculi leading to obstruction of urethra and inability to void bladder. In case treatment (urinary catheter insertion and bladder flush) is not possible or with recurrent obstruction.

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

Ewe: 10%  
 Lambs short-term and 72 hours cell tracing: 20%  
 Lambs long-term non-exposed: 30%  
 Lambs long-term LPS-exposed :35%  
 Lambs 12 hours cell tracing: 10%

### F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Ewe: **moderate** (recovery after abdominal surgery, euthanasia immediately after C-section under general anesthesia)

Ewe (term born references): **mild** (delivery of lambs)

Lamb short-term: **moderate** (mechanical ventilation under minimal sedation)

Lamb long-term: **moderate** (mechanical ventilation with minimal sedation, postnatal survival incl. anesthesia for MRI, blood collection, and other experimental procedures)

Lambs term reference control: **mild** (anesthesia for MRI, blood collection, and other experimental procedures)

### G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p><b>Replacement:</b></p> <p>Animal experiments are needed because the patients for who this new therapy is developed are premature babies, who are extremely vulnerable and susceptible for injury and organ damage with potential life-long consequences. Currently there are no suitable alternatives for the complex events of antenatal infection/inflammation (chorioamnionitis), preterm birth and postnatal intensive care. In this is a translational study, the contribution of a multitude of organ systems that are involved in the pathogenesis of EoP will be studied. This in combination with multiple application routes and long-term functional outcomes cannot be assessed solely <i>in vitro</i>. Moreover, the required biological samples to assess the outcome parameters cannot be sampled from humans. Importantly, we use state-of-the-art culture techniques (organoids) from postmortem acquired tissues from sheep and human tissues acquired during surgery to investigate sub-questions in this project. However, these <i>in vitro</i> assays cannot replace the complex setting of EoP, thereby mandating animal experiments.</p>
Vermindering	<p><b>Reduction:</b></p> <p>Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to reduce drop-out rates. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data and prevent</p>

	<p>unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between gender since our clinical population consists of both sexes.</p> <p>With the use of state of the art culture techniques (organoids from post-mortem tissues), we are able to answer research questions that initially would require additional animals.</p> <p>By using non-invasive techniques such as MR imaging, we enable longitudinal assessment of neurodevelopment in a single animal that would otherwise only be possible postmortem.</p> <p>We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 22 animals. Moreover, we will combine our long-term control groups for IV and IN administration, as the effects of both sham treatments (IV saline or IN saline) can be ignored.</p>
Verfijning	<p><b>Refinement:</b></p> <p>The choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, the developmental biology of sheep and humans is very similar. For example, white matter myelination in lambs and humans starts before birth, compared to rodents in which this process starts postnatal. Therefore, we have established an animal model of immature neurodevelopment in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice.</p> <p><u>Ewe:</u></p> <p>We have adjusted post-operative housing requirements from solitary housing to group housing. This has resulted in reduced postoperative complications, including infection, motility abnormalities and fetal demise. Moreover, group housing has improved well-being of the ewes as these conditions enable natural behavior.</p> <p>Our experiments will be conducted by a highly trained staff that has been trained to recognize and act upon discomfort such as pending labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.</p> <p><u>Lambs:</u></p> <p>Ventilation with sedation on indication in combination with positioning of the fetus in a sling with free movement of the legs enables the lamb to maintain blood pressure and prevent complications associated with alterations in blood pressure such as edema and capillary leakage. In addition, presence of a suckling reflex will enable peristalsis and therefore make enteral feeding with colostrum possible, which is essential for survival and well-being of the newborn lamb.</p> <p>We keep all lambs as much as possible in groups (minimal 2) to ensure more natural behavior (less focus and reliance on humans) and reduced stress.</p> <p>Furthermore, the lambs on the lamb intensive care unit are continuously monitored 24 hours/day by a highly trained and experienced team enabling early recognition of complications and discomfort and to act upon recognition. Moreover, we have actively acquired input from clinical professionals (nurses) who work on the Neonatal Intensive care Unit with regard to hygiene, infection prevention, medication, and use of reusables/disposables. This has resulted in reduced number of infections and increased neonatal survival.</p>
Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?	
<input checked="" type="checkbox"/> Nee <input type="checkbox"/> Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.	



## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

## I. Herhaling

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

n/a

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

The ewes that give birth (natural delivery) to the term reference control lambs, will be offered for adoption.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Ewe: all ewes will be euthanized at the end of the experiment since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection and abdominal surgery.

Lambs: all lambs will be humanely euthanized at the end of the experiment as postmortem laboratory analyses of tissues and organs is crucial to determine our outcome parameters.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

All animals will be euthanized by an intravenous injection with an overdose sodium pentobarbital following sedation/general anesthesia.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

---

Naam van het project	Stamceltherapie voor de behandeling van hersenschade bij te vroeg geboren baby's
NTS-identificatiecode	NTS-NL-543917 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Vroeggeboorte Stem cellen Hersenschade
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Van alle kinderen in Nederland wordt ongeveer 7% te vroeg geboren. Er is sprake van vroeggeboorte indien de zwangerschap korter duurt dan 37 weken. Naast de onvolledige ontwikkeling van organen ten gevolge van de vroeggeboorte, dragen vruchtwaterinfecties ook direct bij aan een verstoorde orgaanontwikkeling waaronder het brein bij het ongeboren kind. Daarnaast zijn de longen van vroeggeboren baby's vaak onrijp waardoor de ademhaling na de geboorte ondersteund moet worden op een Neonatale Intensive Care Unit. Echter, ondanks dat ondersteuning van de ademhaling door middel van mechanische ventilatie levensreddend is, kan bijdragen aan blijvende schade aan de hersenen van deze kinderen.</p> <p>In dit project wordt onderzocht in een schapenmodel of deze ontwikkelingsachterstand behandeld kan worden met behulp van stamcellen. De stamcellen die in dit project worden getest hebben twee belangrijke eigenschappen: (1) ze kunnen ontstekingsreacties die ten grondslag liggen aan hersenschade bij vroeggeborenen remmen; en (2) ze kunnen het lichaamseigen weefselherstel bevorderen. Gebruik makende van deze twee eigenschappen, zullen wij zullen onderzoeken welke toedieningsroute van stamcellen; zijnde in de bloedbaan of door middel van neusdruppels het beste werkt op specifieke momenten in het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen. Wij verwachten dat toediening via de bloedbaan namelijk meer ontstekingsremmend zal werken en dat toediening van via neusdruppels zal meer weefselherstellend zal zijn. Ook zullen wij de effecten onderzoeken van een combinatie van de twee toedieningsroutes. Naast het testen van verschillende toedieningsroutes op verschillende tijdstippen in het ziekteproces, zullen wij de toegediende cellen opvolgen om inzicht te krijgen waar ze in het lichaam naar toe gaan, hoe lang ze in het lichaam blijven en hoe ze exact werken.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op	<p>Dit onderzoek levert inzichten op over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan het brein na vroeggeboorte. Naast onderzoek van het brein zullen in dit onderzoek ook gegevens worden verzameld van andere orgaansystemen. We verwachten meer inzichten te verkrijgen in het ontstaan van schade van meerdere organen bij vroeggeborenen, leidend tot meer gerichte aanknopingspunten voor aanvullende behandelingen.</p>

lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De schapen zullen een operatieve ingreep onder algehele narcose ondergaan. Tijdens deze operatie zullen katheters worden geplaatst in de bloedvaten van de foetus. In een later stadium zal een vruchtwaterinfectie worden opgewekt door middel van een injectie van een bacterieel bestanddeel in het vruchtwater via een katheter die tijdens de bovengenoemde operatie is geplaatst. Het lam zal middels een keizersnede onder algehele narcose worden geboren. Tijdens de keizersnede zullen extra infusen worden geplaatst en een buisje in de keel worden geplaatst waardoor het lam op de intensive care kunstmatig beademd wordt. Op de intensive care zal het lam naast kunstmatige beademing, medicatie toegediend krijgen via de aangelegde infusen. De lammeren (zowel vroeggeboren als voldragen) die opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen tweemaal onder algehele narcose een MRI scan ondergaan. Tevens zal bij de lammeren maandelijks een bloedafname worden gedaan.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>“De schapen zullen een operatieve ingreep ondergaan die kan leiden tot wondpijn. Een infectie in het vruchtwater kan fysiek ongerief voor de foetus veroorzaken. Echter, tijdens de zwangerschap is het bewustzijnsniveau van de foetus gering, waardoor dit ongerief niet als dusdanig ervaren zal worden.</p> <p>De ooien zullen, evenals de mens, geen symptomen of ongerief ondervinden van een vruchtwaterinfectie. De ooien zullen een keizersnede ondergaan onder algehele narcose. De lammeren worden na de vroeggeboorte verzorgd op een neonatale intensive care unit en zullen kunstmatig beademd worden. Deze kunstmatige beademing is noodzakelijk voor de overlevingskansen van de lammeren, maar speelt ook een cruciale rol bij het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen. Kunstmatige beademing Dit kan leiden tot ongerief in de vorm van pijn en benauwdheid. Door adequate pijnstilling en ventilatie strategieën uitgevoerd door getraind personeel zal dit tot een minimum beperkt blijven.</p> <p>Een gedeelte van de lammeren zal na beëindiging van de kunstmatige beademing worden gedood ten behoeve van laboratoriumanalyse van de korte termijneffecten van de stamcelbehandeling. Een tweede gedeelte van de vroeggeboren schapen zal na beëindiging van de kunstmatige beademing opgroeien tot volwassen leeftijd om de lange termijneffecten van de stamcel therapie te onderzoeken. Gedurende deze periode waarin de lammeren opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen deze lammeren onder algehele narcose een MRI-scan ondergaan van het brein. Aan het einde van de lange termijnoverleving zullen ook deze lammeren worden gedood ten behoeve van laboratoriumanalyses die alleen plaats kunnen vinden op postmortaal verkregen weefsels. Deze lange termijneffecten zullen worden vergeleken met een groep à terme lammeren die spontaan zijn geboren. Deze lammeren dienen referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt.”</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Schapen (<i>Ovis aries</i>)</td> <td>304</td> <td>0</td> <td>12</td> <td>292</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	304	0	12	292	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	304	0	12	292	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Schapen (<i>Ovis aries</i>)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	12					
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	12														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Na de experimentele procedure zullen de ooien en de lammeren op humane wijze worden gedood om weefsels voor verder laboratoriumonderzoek te verkrijgen. Een deel van de ooien zal natuurlijk</p>																

bevallen van een lam. Deze ooien zullen na afloop van het experiment ter adoptie worden aangeboden.

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

In het huidige experiment bootsen we de klinische situatie na van een vruchtwaterinfectie (chorioamnionitis), vroeggeboorte en zorg voor vroeggeborenen op een intensive care. Al deze elementen dragen bij aan het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen en dit ziekteproces, waarin een groot aantal orgaansystemen betrokken zijn, proces kan nog niet nagebootst worden middels proefdiervrije alternatieven of knaagdieren. Belangrijk is dat we gebruik maken van weefsels van schapen die postmortaal verkregen zijn en weefsel van mensen die tijdens de operatie zijn verkregen om onderzoeksvragen te beantwoorden die in eerste instantie aanvullende dierproeven zouden vereisen.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Door ruime ervaring met schapen en het verzorgen van lammeren op de lammeren intensive care unit zijn wij in staat om uitval te beperken. Onze experimenten worden uitgevoerd door zeer ervaren personeel volgens gevestigde protocollen. Deze methoden zijn in het voordeel van reproduceerbaarheid en gebruik van eerder verkregen historische gegevens en voorkomen onnodig gebruik en verlies van dieren. Bovendien maken we geen onderscheid tussen geslacht, aangezien onze klinische populatie uit beide geslachten bestaat. Door gebruik te maken van niet-invasieve technieken zoals MRI-scans, kunnen we de hersenontwikkeling herhaaldelijk in één enkel dier bestuderen zonder dat een dier hiervoor zal komen te overlijden. Hierdoor kunnen wetenschappelijke inzichten vaker en met minder dieren verworven worden. Door de voorgestelde experimenten om de stamcellen op te volgen uit te voeren in dezelfde dieren als nodig zijn voor de voorgestelde korte termijn experimenten, kunnen we het aantal benodigde dieren verminderen.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Ooi:  
We hebben de huisvesting na de operatie voor de ooiën aangepast van individuele huisvesting naar groepshuisvesting. Dit heeft geleid tot minder postoperatieve complicaties, waaronder infectie, een verbeterde werking van het maag-darm-stelsel, en minder overlijden van de foetus. Bovendien heeft groepshuisvesting het welzijn van de ooiën verbeterd, aangezien deze omstandigheden natuurlijk gedrag mogelijk maken. Onze experimenten zullen worden uitgevoerd door hoog opgeleid personeel dat is opgeleid om klinische verschijnselen, zoals in spontane weeën en vroeggeboorte, te herkennen en erop te reageren. Erkenning van spontane bevalling verkleint de kans op complicaties en verbetert het dierenwelzijn.

Lammeren:  
Tijdens kunstmatige beademing zullen de lammeren in een hangmat worden geplaatst. Deze hangmat maakt het mogelijk voor het lam om te bewegen, waardoor de bloeddruk bloeddruk op peil gehouden kan worden en de gevolgen van bloeddrukschommelingen voorkomen voorkomen kunnen worden. Bovendien zal de aanwezigheid van een zuigreflex de peristaltiek mogelijk maken en daardoor voeding met moedermelk mogelijk maken, wat essentieel is voor de overleving en het welzijn van het pasgeboren lammetje. We houden alle lammeren zoveel mogelijk in groepen om te zorgen voor natuurlijker gedrag, minder stress en minder focus op en afhankelijkheid van de mens. de experimenten op de intensive care voor vroeggeboren lammeren worden uitgevoerd door hoog opgeleid personeel zoals klinische professionals (neonatologen en verpleegkundigen) die normaliter werkzaam zijn op de Neonatale Intensive Care. Dit heeft geresulteerd in een verminderd aantal infecties en een verhoogde neonatale overleving.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

De keuze van het diermodel is gebaseerd op de lichaamsgrootte, gebruik van vergelijkbare apparatuur als op de neonatale intensive care en grote overeenkomsten in de ontwikkelingsbiologie tussen mensen en schapen. Hierdoor kunnen bevindingen in ons diermodel kunnen eenvoudig worden vertaald naar de klinische praktijk. De leeftijd van de foetus is gekozen omdat dit een overeenstemming is met de hersenontwikkeling en de longontwikkeling van de grootste groep vroeggeborenen in het ziekenhuis.



**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	01-03-2022
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	28-02-2027
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 18 februari 2022 11:58  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202215869  
**Bijlagen:** PV2022\_001\_5.1 lid2e\_Projectvoorstel\_lvd.docx.pdf; PV2022\_001\_5.1 lid2e\_NTS\_lvd.xlsx; PV2022\_001\_5.1 lid2e\_Appendix1\_lvd.pdf; PV2022\_001\_5.1 lid2e\_Aanvraag\_lvd.pdf

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202215869.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 18-02-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermin vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 18-02-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,  
 Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0800 789 0789  
 E: info@zbo-ccd.nl

## 5.1 lid2h Advies PV 2022-001- AVD 5.1 lid2h 202215869; 5.1 lid2e

### Preambule

De 5.1 lid2h verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de 5.1 lid2h.

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 5.1 lid2h
2. **Titel van het project:** Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity
3. **Titel van de NTS:** Stamceltherapie voor de behandeling van hersenschade bij te vroeg geboren baby's
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:** 5.1 lid2h, contactpersoon: 5.1 lid2e  
, emailadres: 5.1 lid2h
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**
  - ontvangen door DEC 18.02.2022
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken 25.02.2022
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en)
    - a. van 07.03.2022 tot 16.03.2022 (toelichtingsvragen gesteld)
    - b. van 22.03.2022 tot 22.03.2022 (toelichtingsvragen gesteld)
    - c. van 25.03.2022 tot 25.03.2022 (aanvullende vraag gesteld)
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD 25.03.2022
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**  
De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. **Eventueel horen van aanvrager:** Niet van toepassing
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - **Datum:** 07.03.2022 / 22.03.2022 / 25.03.2022
  - **Gestelde vraag/vragen:** Zie bijlage 1, 2 en 3
  - **Datum antwoord:** 16.03.2022 / 22.03.2022 / 25.03.2022
  - **Verstrek(e) antwoord(en):** Zie bijlage 1, 2 en 3
  - **De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag:**
10. **Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC):** Niet van toepassing

## 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 nieuwe aanvraag
- 3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?** JA
- 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.** NEE

## C. Beoordeling (inhoud)

- 1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.**

Te vroege geboorte van kinderen en de daaropvolgende behandeling op de intensive care gaan gepaard met inflammatie en neuroinflammatie. Als gevolg daarvan is de kans op overlijden, hersenschade en ontwikkelingsachterstand van te vroeg geboren kinderen groot. Dit ziektebeeld staat bekend staat als Encephalopathy of Prematurity (EoP). In dit projectvoorstel willen de onderzoekers de optimale toedieningsstrategie en de therapeutische effecten van stamceltherapie onderzoeken. Ze doen dit in een diermodel voor vroeggeboorte in schapen waarin ook perinatale inflammatoire challenges en de behandeling daarvan goed gemodelleerd kunnen worden.

In voorgaand werk in dit diermodel heeft de onderzoeksgroep o.a. laten zien dat behandeling met mesenchymale stamcellen, afkomstig uit de navelstreng, veelbelovende resultaten geeft na een hypoxisch/ischemisch trauma. Dit type stamcellen wekt minder immuunreactie op, heeft immuunmodellerende effecten en er kleven minder ethische bezwaren aan, dan aan het gebruik van embryonale stamcellen. Uit dit onderzoek en uit vergelijkbaar onderzoek in knaagdieren is ook gebleken dat de timing van toediening in interactie met de toedieningsroute (intra-veneus / intra-nasaal) een grote rol kan spelen bij de effectiviteit van de behandeling.

In het voorgestelde onderzoek wordt o.b.v. deze eerdere resultaten bij drachtige oöien intra-amnietisch een LPS challenge gegeven om een inflammatoire context te genereren. Een aantal dagen later worden de lammeren via een keizersnede te vroeg geboren en op de IC beademd en in leven gehouden. De lammeren worden vervolgens op verschillende tijdstippen, direct na de geboorte (iv), en/of twee maanden na de geboorte (intra-nasaal) behandeld met stamcellen. De bio distributie van de stamcellen zal worden bepaald en de effecten op o.a. (neuro)inflammatie en effecten op de ontwikkeling, zoals cognitie en de hoeveelheid witte stof in de hersenen van de lammeren zullen worden gemeten.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het project lijkt de meeste kenmerken te hebben van voorbeeld 1 uit de Handreiking 'Invulling definitie project'. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De 5.1 lid2h 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 5.1 lid2h van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

- 2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de**

**proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).**

Voor zover de **5.1 lid2h** de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten.

**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. Het project heeft als overkoepelend translationeel doel het verbeteren van de behandeling van te vroeg geboren kinderen, zodat de kans op overleving groter en de kans op hersenschade kleiner wordt. Daarnaast draagt het project bij aan het vergroten van kennis over zowel de effecten van een prenatale inflammatoire challenge, in combinatie met vroeggeboorte, op de hersenen en andere organen, als ook kennis over de kinetiek van de toegediende stamcellen in het lichaam.

***Belangen en waarden***

**4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK' : Stap 1.C4; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).**

Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzicht in de effecten van en de optimale tijdstippen en toedieningsroutes van de behandeling met mesenchymale stamcellen bij te vroeg geboren lammeren. Daarnaast wordt meer kennis verworven over de werkingsmechanismen en de distributie van intra-veneus en intra-nasaal toegediende mesenchymale stamcellen, bij te vroeg geboren lammeren. Het uiteindelijke doel is het verbeteren van de behandelingsmogelijkheden voor te vroeg geboren kinderen zodat meer kinderen overleven en de kans op hersenschade kleiner wordt. Het betreft hier een overwegend translationeel project met ook fundamentele aspecten. Er is binnen dit project wel een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel, het gekozen diermodel heeft bewezen translationele waarde. De **5.1 lid2h** acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat uit eerder onderzoek gebleken is dat mesenchymale stamceltherapie grote potentie heeft. De effecten kunnen echter afhankelijk zijn van het moment van toedienen en de manier van toedienen. Er is dus behoefte aan meer kennis over deze factoren en aan kennis over mechanismen die ten grondslag liggen aan de positieve effecten van de stamcellen in een diermodel met grote translationele waarde. Het beschreven onderzoek in het schapen model voor vroeggeboorte, is een noodzakelijke stap in de ontwikkeling van nieuwe behandelingsmogelijkheden voor te vroeg geboren kinderen. De **5.1 lid2h** is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van inzicht in de effecten van en de optimale tijdstippen en toedieningsroutes van de behandeling met mesenchymale stamcellen in te vroeg geboren lammeren gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

**5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de**

**belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele en fundamentele project dat gericht is op de ontwikkeling van een stamceltherapie voor EoP zijn de proefdieren, de toekomstige patiënten, de onderzoekers en de industrie.

**Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:**

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen. Drachtige ooiën zullen worden blootgesteld aan echografie, intramusculaire injecties, chirurgische handelingen zoals het aanbrengen van katheters in de baarmoeder en de foetus, intra-amniotische blootstelling aan LPS, bloedsampling via de aangebrachte katheters, en geboorte van het lam via een keizersnede onder anesthesie gevolgd door het doden van de ooi. In een klein aantal controle dieren wordt geen prenatale instrumentatie toegepast en worden de lammeren op een natuurlijke manier geboren. Lammeren zullen worden blootgesteld aan een combinatie van onderstaande handelingen: chirurgische handelingen onder anesthesie zoals het aanbrengen van veneuze en arteriële katheters, intra-amniotische blootstelling aan LPS, het nemen van bloedmonsters via de katheters, intra-veneuze toediening van stamcellen, te vroeg geboren worden middels keizersnede onder anesthesie, echografie, EEG metingen, behandeling op de intensive care inclusief beademing. Een gedeelte van de lammeren zal opgroeien zonder moeder en op latere leeftijd zal intra-nasaal stamcellen worden toegediend, zullen MRI scans en EEG metingen onder anesthesie worden gedaan en zullen gedragstesten (Gang analyse en een doolhof test) worden uitgevoerd. Alle lammeren worden gedood onder terminale anesthesie om weefsels te verzamelen.

De fundamentele waarde van leven zal de meeste dieren in het kader van voorgesteld onderzoek ontnomen worden. De proefdieren zullen verschillende handelingen ondergaan en moeten leven met de gevolgen daarvan, waaronder het ondervinden van ongerief gedurende de proeven.

**Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden:**

De onderzoekers verkrijgen inzicht in de effecten en de optimale tijdstippen en toedieningsroutes van de behandeling met stamcellen in een lammerenmodel. Daarnaast wordt meer kennis verworven over de werkingsmechanismen en de distributie van intraveneus en intra-nasaal toegediende stamcellen, in te vroeg geboren lammeren. De onderzoekers kunnen over de opgedane kennis wetenschappelijk publiceren.

**Waarden die voor (toekomstige) patiënten bevorderd worden:**

De gezondheid van toekomstig patiënten en hun ouders zal potentieel verbeterd worden. Bij een betere behandeling kan hersenschade voorkomen worden of verminderd worden en wordt de prognose beter. Hierdoor zal de kwaliteit van leven van de kinderen en hun naasten, zoals de ouders, verbeterd worden.

**Waarden die voor de farmaceutische industrie bevorderd worden:**

De farmaceutische partner voorziet de onderzoekers van de stamcellen en zal inzicht verkrijgen in de mogelijkheden en effectiviteit van de stamcellen in dit diersmodel die behulpzaam kan zijn bij de verdere ontwikkeling van de stamcellen.

**6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op**

## het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de **5.1 lid2h** de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

### **Proefopzet en haalbaarheid**

#### **7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C5).**

Voor zover de **5.1 lid2h** kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met het ontwikkelen en het gebruiken van dit specifieke proefdiermodel. De onderzoeksgroep heeft ook een goede positie in het onderzoeksveld zoals o.a. blijkt uit wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's onder meer geïllustreerd aan de hand van publicaties in tijdschriften als *American Journal of Pathology*, *Stem cells translational medicine*, *Pediatric Research*, en *Journal of neuroinflammation*.

#### **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 beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C6).**

De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande het gebruik van mesenchymale stamcellen om negatieve effecten van vroeggeboorte te behandelen 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 **5.1 lid2h** leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

### **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 of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C1; zie bijlage III voor CCD toelichting en voorbeelden).**

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)**
- Niet-menselijke primaten (10e)**
- Dieren in/uit het wild (10f)**
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)**
- Zwerfdieren (10h)**
- Hergebruik (1e, lid 2)**
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)**
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)**
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)**

De pasgeboren lammeren zullen sedatievrij worden beademd op de intensive care unit. De **5.1 lid2h** heeft hierover een vraag gesteld aan de onderzoekers. De onderzoekers geven aan dat de keuze hiervoor een verfijning is o.b.v. eerdere

ervaringen met het model. Door lammeren niet te sederen is het lam in staat om zelf fysiologische parameters zoals bloeddruk en maagperistaltiek te reguleren. Dit heeft positieve effecten op het welzijn en de overleving van de lammeren.

**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 richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.**

De **5.1 lid2h** heeft zich ervan verzekerd dat dit het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt J in de bijlagen.

Er wordt naar gestreefd om alle dieren in groepen te huisvesten, maar oaien zullen rondom de geboorte tijdelijk kortdurend apart worden gehuisvest om complicaties te voorkomen. Er is een kleine kans dat opgroeiende lammeren tijdelijk alleen gehuisvest zijn, als alle groepsgenoten zouden uitvallen en er een nieuwe groep gevormd moet worden.

**11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C2).

De **5.1 lid2h** acht het ongerief realistisch ingeschat, zoals weergegeven in bijvoorbeeld de tabel onder punt F in appendix 1. Daaruit blijkt dat het cumulatief ongerief voor het merendeel van de oaien en de lammeren matig zal zijn (96%). Alleen de oaien uit de groep met normaal geboren controle lammeren ondergaan mild ongerief (4%).

**12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C2). (zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan.

Drachtige oaien zullen worden blootgesteld aan echografie, intramusculaire injecties, chirurgische handelingen zoals het aanbrengen van katheters in de baarmoeder en de foetus, intra-amniotische blootstelling aan LPS, sampling via de aangebrachte katheters, en geboorte van het lam via een keizersnede onder anesthesie gevolgd door het doden van de ooi. In een klein aantal controle dieren wordt geen prenatale instrumentatie toegepast en worden de lammeren op een natuurlijke manier geboren. Lammeren zullen worden blootgesteld aan een combinatie van onderstaande handelingen: chirurgische handelingen onder anesthesie zoals het aanbrengen van veneuze en arteriële katheters, intra-amniotische blootstelling aan LPS, het nemen van bloedmonsters via de katheters, intra-veneuze toediening van stamcellen, te vroeg geboren worden middels keizersnede onder anesthesie, echografie, EEG metingen, behandeling op de Intensive care inclusief beademing. Een gedeelte van de lammeren zal zonder moeder grootgebracht worden en op latere leeftijd worden intra-nasaal stamcellen toegediend, worden MRI scans en EEG metingen onder anesthesie gedaan en gedragstesten (Gang analyse en een doolhof test) uitgevoerd. Alle lammeren worden gedood onder terminale anesthesie om weefsels te verzamelen.

De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van een gedeelte van de dieren



wordt tevens fysiek aangetast door het aanbrengen van katheters en het ondergaan van een keizersnede. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid, bijvoorbeeld tijdens de verzorging op de intensive care. Het is ook mogelijk dat dieren kortstondig individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren slechts beperkt natuurlijk gedrag kunnen vertonen.

**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 beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).**

Naar de mening van de **5.1 lid2h** zijn de humane eindpunten zeer zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage van 5 – 35% (afhankelijk van de experimentele groep) van de dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

**3V's**

**14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).**

De **5.1 lid2h** is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken. Er is door de onderzoekers ook voldoende aannemelijk gemaakt dat onderzoek naar de toedieningsstrategie en de therapeutische waarde van stamcellen in een model met hoge translationele waarde een belangrijke stap is voor eventueel verdergegaan kan worden met klinische trials in zeer kwetsbare patiëntjes.

**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. Licht uw beoordeling toe. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).**

Naar de mening van de **5.1 lid2e** 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 wetenschappelijk resultaat dit mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse, beschikbare literatuur en behaalde resultaten in het verleden. Ook zijn tijdpunten voor metingen van bio distributie van stamcellen zo gekozen dat ze gedeeltelijk overlappen met andere experimenteel belangrijke tijdpunten zodat metingen gecombineerd kunnen worden en er minder dieren hoeven te worden gebruikt.

**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 beoordeling toe.** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).

De 5.1 lid2h 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 zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de 5.1 lid2h onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken. De aandacht van de onderzoekers voor verfijning van de proeven blijkt ook uit de zeer goed omschreven humane eindpunten o.b.v. eerdere ervaring met het model.

**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. Licht uw beoordeling toe.**

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

***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.** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke lammeren. Uiteraard kunnen alleen drachtige oaien worden gebruikt.

**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 richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).

Naar de mening van de 5.1 lid2h is dit goed beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. De lammeren moeten worden gedood in het kader van de proef om weefsels te kunnen verzamelen ter bestudering van de effecten.

In alle gevallen worden dieren gedood volgens een dodingsmethode die beschreven staat in de richtlijn 2010/63/EU.

**20. Indien dieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.**

Het grootste gedeelte van de ooien zal moeten worden gedood omdat de gevolgen van het aanbrengen van intra-amniotische katheters, toediening van LPS en de gevolgen van de keizersnee te veel ongerief veroorzaken en hergebruik in de weg staan. De 5.1 lid2h heeft de onderzoekers hierover vragen gesteld en de onderzoekers hebben voldoende aannemelijk gemaakt dat overleving van deze ooien niet realistisch is. De ooien die de controle lammeren op de normale tijd en manier ter wereld brengen zullen niet worden gedood en ter adoptie worden aangeboden.

**NTS**

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h is dit het geval.

## **D. Ethische afweging**

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

Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van preterme geboorte, op tegen de opoffering het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan?

**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. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 3.B; zie bijlage III voor CCD-voorbeelden).

- Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel
- Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: substantieel voordeel.
- Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: substantieel voordeel.
- Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.

De 5.1 lid2e is van mening dat de belangen van toekomstige te vroeg geboren kinderen en hun naasten die te maken hebben met hersenschade, achterblijvende ontwikkeling of zelfs overlijden, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, die meer inzicht krijgen in de effectiviteit en optimale strategie voor een stamceltherapie binnen het project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot mild ongerief, of de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Alle lammeren en een deel van de ooiën zullen opgeofferd worden aan het einde van de experimentele procedures, en worden daardoor de waarde van leven ontnomen. Alleen de ooiën die a terme lammeren zullen ter adoptie worden aangeboden. De onderzoekers geven aan dat voor 96% van de dieren het ongerief matig zal zijn, en voor 4% van de dieren mild. De integriteit van de schapen wordt met name aangetast door de keizersnede en het plaatsen van katheters. In een gedeelte van de lammeren zal de ontwikkeling na een aantal maanden gevolgd worden met beeldvormende technieken en gedragstesten. 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.

Wereldwijd worden er jaarlijks 15 miljoen baby's te vroeg geboren, waarvan 12.000 in Nederland. Door vroeggeboorte is er kans op allerlei schadelijke neurologische effecten voor de lange termijn, de Encephalopathy of Prematurity (EoP). Indien de doelstellingen bereikt worden, zullen de onderzoekers kennis vergaren over de effectiviteit en te hanteren strategie van een veelbelovende stamceltherapie voor EoP. Dit onderzoek biedt daarmee perspectief op een meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Vandaar dat de **5.1 lid2h** 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. 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). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 3.C; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).**

De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van pre-terme geboorte, op tegen de opoffering, het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan bevestigend. De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening wegen de substantiële belangen van onderzoekers en toekomstige patiëntjes en hun naasten en de reële belangen van de industrie in dit project, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren.

De **5.1 lid2h** 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 de voorgestelde 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, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De 5.1 lid2h 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 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" van een positief advies.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 4.A; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.

Een minderheidsstandpunt werd ingenomen door een 5.1 lid2h lid. Dit lid had bezwaren tegen de experimentele opzet van het onderzoek. De onderzoekers hebben niet overtuigend middels data aangetoond dat het zonder ooi opgroeien van pre-term lammeren geen extra confounder creëert ten opzichte van a-term geboren lammeren die opgroeien bij de ooi in relatie tot de uitkomstmaat van cognitieve en locomotieontwikkeling. Hiermee is de wetenschappelijke kwaliteit van het onderzoek in gevaar, en daarmee ook de ethische acceptatie van onderhavig onderzoeksvoorstel.

### 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 bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 4.B).

De 5.1 lid2h had initieel veel vragen bij uitvoeringsaspecten van het project en de invloed daarvan op de waarde van de resultaten. Deze vragen zijn door de onderzoekers uitgebreid beantwoord en hebben tot bijstelling van het voorstel geleid. Er is in de vergadering ook gesproken over of deze dierproeven bijdragen aan het verder verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen, en de wenselijkheid daarvan. De onderzoekers is gevraagd hierop te reflecteren. De onderzoekers hebben naast deze reflectie in hun antwoord ook aangegeven dat dit onderzoek niet primair gericht is op extreem te vroeg geboren kinderen maar met name op het kunnen behandelen van onvermijdelijke vroeggeboorten na 28 weken zwangerschapsduur, waarvoor een duidelijke klinische behoefte aan betere therapie bestaat.

## Bijlage I:

### Vragen 5.1 lid2h d.d. 07-03-2022 en Antwoorden VO d.d. 16-03-2022

#### Fundamentele vragen 5.1 lid2h

##### Algemeen

1. **Waarom weegt voor u(w onderzoeksgroep) het belang van het voorgestelde project zwaarder dan het matige ongerief en de schending van integriteit en de beëindiging van het leven dat de proefdieren wordt aangedaan?**

Hersenschade bij vroeggeborenen is nog steeds een 'unmet medical need' die in het latere leven verstrekende gevolgen kan hebben, zoals motorische of verstandelijke beperkingen en gedrags- en emotionele problemen. Ook de impact op de omgeving (ouders/verzorgers) is in veel gevallen zeer groot voor de rest van het leven. Daarnaast zorgen directe en indirecte kosten voor een enorme druk op ons zorgstelsel en de maatschappij in het algemeen.

In het kader van toepassing van de 3 V's zijn wij ervan overtuigd dat er op dit moment geen alternatieven zijn die de complexiteit van de pathofysiologie van premature hersenschade nagebootst wordt. Desalniettemin heeft onze onderzoeksgroep in de afgelopen jaren zeer veel ervaring opgedaan met dit model en reeds diverse aanpassingen doorgevoerd waarmee het ongerief van de dieren en het aantal benodigde dieren is gereduceerd.

In deze context achten wij de preklinische studie, en het daarmee gepaard gaande matige ongerief, schending van integriteit en de beëindiging van het leven van de proefdieren, die beoogt te voorzien in therapie voor gerechtvaardigd.

2. **Hersenaandoeningen t.g.v. vroeggeboorte (EoP) zijn deels ook een consequentie van het feit dat prematuur geboren kinderen in een steeds eerder stadium in de zwangerschap in leven kunnen worden gehouden. Uiteraard heeft dat dan gevolgen voor de ontwikkeling van (het brein van) deze kinderen. Kunt u reflecteren op de vraag of er grenzen zijn aan deze ontwikkeling en in hoeverre het door u voorgestelde dierexperimenteel onderzoek het oprekken van de grens nog verder stimuleert?**

Dierexperimenteel onderzoek heeft in de afgelopen decennia een belangrijke bijdrage geleverd in het verbeteren van de geboortezorg. Hierdoor kunnen we vroeggeboren kinderen een steeds betere kans geven op een gezond leven.

Bij de ethische vraagstukken rondom de grens van levensvatbaarheid en extreme vroeggeboorte speelt dierexperimenteel onderzoek echter een zeer beperkte rol. Anders gezegd, dierexperimenteel onderzoek is niet de drijvende kracht achter de verschuiving van de grens van levensvatbaarheid, maar eerder een antwoord daarop om deze kinderen een optimale kans te geven. Het is uiteraard wel onvermijdelijk dat de vooruitgang in perinatale zorg, die dus deels door dierexperimenteel onderzoek gestimuleerd is, gepaard gaat met een verschuiving van de grens van levensvatbaarheid.

In het kader van dit projectvoorstel is het overigens belangrijk om te realiseren dat wij ons niet zo zeer richten op extreme vroeggeboorte (< 28 weken), maar met op de veel grotere groep prematuren van 28 weken en ouder, waarvan we weten dat hun ontwikkeling - na onvermijdelijke vroeggeboorte - bedreigd is. Het is echter niet ondenkbaar dat de resultaten die geboekt worden in het voorgestelde project, geëxtrapoleerd kunnen worden naar de extreem vroeggeborenen.

#### 3.1 Achtergrond | Background

3. **De 5.1 lid2h vraagt om de achtergrond omtrent immuun modulatie beter uit te werken, aangezien dit een behandeling lijkt te zijn met hoge potentie. Zijn er resultaten bekend in bredere context buiten stamcellen?**

Immuun-modulatie in het kader van perinatale ontstekingsstress is in het verleden al succesvol gebleken. In dit kader hebben wij veelbelovende resultaten geboekt met het pro-resolving molecuul Annexine A1 (ANXA1) (Gussenhoven, R., et al., J Clin Med, 2019. 8(2)). Relevant in dit kader is dat ANXA1 een van de belangrijke trofische factoren is die door stamcellen wordt uitgescheiden.

Tevens zijn er belangrijke bevindingen verkregen buiten het stamcel veld:

In eerdere preklinische studies hebben wij en anderen succesvol het beschermende effect aangetoond van meerdere immuun-modulatoire interventies zoals IL-2 [1, 2], IL-1 receptor antagonist [3] en voedingscomponenten (planten sterolen) [4] op orgaanschade ten gevolge van *in utero* blootstelling aan inflammatie in preterme schapen.

Daarnaast hebben meerdere studies aangetoond dat inhibitie of antagonisme van pro-inflammatoire cytokines neuroprotectie biedt na *in utero* inflammatie en hypoxie-ischemie [5, 6].

Al dit voorwerk onderstreept potentiële belang van immuun-modulatie door stamcellen. Dit tezamen met de regeneratieve eigenschappen van stamcellen maakt deze therapie veelbelovend. Wij hebben immuun-modulatie als therapeutische interventie verder uitgewerkt in sectie 3.1 van het projectvoorstel.

1. Nikiforou, M., et al., Inflammatory bowel diseases, 2015. **21**(9): p. 2026-2038.
2. Willems, M.G., et al., American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2015. **310**(1): p. L1-L7.
3. Wolfs, T.G., et al., Mucosal immunology, 2013. **6**(3): p. 547-556.
4. van Gorp, C., et al., Nutrients, 2019. **11**(5): p. 968.
5. Galinsky, R., et al., Journal of Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 1-16.
6. Disdier, C., et al., Brain sciences, 2018. **8**(6): p. 101.

4. De **5.1 lid2h** vraagt om aan te geven wat de noodzaak is om deze studies in lammeren uit te voeren.

Een deel van het werk rondom stamcel therapie in de perinatale context wordt door collega's uitgevoerd in knaagdiermodellen. Helaas hebben deze proefdiermodellen enkele belangrijke beperkingen, zeker als het gaat om vertaling van preklinische gegevens naar de kliniek, en met name translatie naar een kwetsbare patiëntenpopulatie zoals (vroeggeboren) kinderen:

1. De ontwikkelingsstadia van orgaansystemen bij mens en schaap tijdens de zwangerschap, en in de route van baby naar volwassene komen veel beter overeen dan tussen mens en knaagdier. Daardoor kunnen we korte en lange termijneffecten (farmacologisch en eventuele bijwerkingen) nauwkeuriger monitoren in schapen.
2. De lange zwangerschapsduur van schapen maakt het mogelijk om specifieke processen nauwkeuriger te monitoren.
3. De grootte van het lam maakt foetale instrumentatie mogelijk specifieke processen (bijv. inflammatie) en fysiologische parameters (bijv. bloeddruk, hartslag) die kunnen veranderen of ten grondslag liggen aan het ziekteproces nauwkeurig *in utero* gemonitord kunnen worden en daarmee waardevolle inzichten kunnen verschaffen.
4. De perinatale monitoring van belangrijke klinische parameters is in knaagdieren zeer gecompliceerd/niet mogelijk.
5. De grootte van het lam maakt het mogelijk dat klinisch relevante apparatuur gebruikt kan worden in een setting (intensive care unit) die sterk vergelijkbaar is met de klinische situatie.
6. Intraveneuze toediening van stamcellen in knaagdier pups is uiterst gecompliceerd.

Samengevat zijn wij overtuigd dat studies in lammeren de klinische situatie rondom perinatale ontstekingsstress en vroeggeboorte accurater nabootsen dan studies in knaagdieren waardoor klinische translatie makkelijker en realistischer is.

5. U beschrijft dat er geen behandelingen bestaan voor 'preterm brain injury'. Wordt hypothermie onder bepaalde condities niet als behandeling beschouwd?

Het is inderdaad correct dat er geen effectieve behandelingen bestaan om de hersenen van prematuren te beschermen. Therapeutische hypothermie wordt niet toegepast onder een zwangerschapstermijn van 35 weken, omdat koeling bij deze kwetsbare kinderen grotere risico's op complicaties geeft. Daarnaast is therapeutische koeling op dit moment alleen toepasbaar bij kinderen na perinatale asfyxie (hypoxie-ischemie).

6. De **5.1 lid2h** mist de vertaling naar uw specifieke onderzoeksvragen. Dit roept vragen op (zie ook de vragen 7 en 9 onder doel en strategie).

Zie antwoorden vragen 7-9

### 3.2 Doel

#### 7. De 5.1 lid2h mist onderbouwing van de keuze voor uw specifieke onderzoeksvragen:

##### a. De 5.1 lid2h vraagt zich af waarom korte-termijn effecten separaat dienen onderzocht te worden, aangezien dit ook vervat zit in het longitudinaal opvolgen van lange-termijn effecten.

Er is inderdaad overlap tussen de korte en lange termijnstudie. Het unieke aspecten van deze studie is het maken van correlaten tussen functionele, histologische en cellulaire parameters. Dit totaalpakket biedt essentiële inzichten in het ontstaan van brein pathologieën na vroeggeboorte/perinatale ontstekingsstress en de effecten van de therapie.

Dit pakket berust voor een deel op postmortale analyses op zowel de korte en lange termijnuitkomsten.

##### b. Waarom beperkt u zich tot de gekozen tijdpunten & toedieningsroutes en waarom in deze in deze combinatie.

De voorgestelde experimenten zijn onderdeel van het werk dat verricht wordt door het PREMSTEM-consortium. Dit consortium bestaat uit internationale experts op het gebied van perinatale brein problematiek. Er is gekozen om te starten met het testen van een grotere matrix aan behandelstrategieën in knaagdiermodellen. Uit dit werk is heel evident naar voren gekomen dat met name de late intranasale stamcel gift neuro-protectief werkte. Het voorwerk verricht door ons laboratorium en dat van collega's heeft aangetoond dat een intraveneuze toediening van stamcellen binnen 4-6 uur na vroeggeboorte beschermend werkt voor brein en andere orgaansystemen waaronder de long.

Gebaseerd op deze gegevens hebben wij onze behandelstrategieën vastgesteld. Dit voorwerk is ook opgenomen in sectie 3.4 van het projectvoorstel.

##### c. De 5.1 lid2h vraagt zich af wat de noodzaak van doelstelling 3 is.

Doelstelling 3 (cell-tracing) is noodzakelijk om de volgende redenen:

Verondersteld wordt dat SC binnen 72 uur doodgaan. Echter, deze aanname is gebaseerd op technieken met een relatief lage sensitiviteit. De voorgestelde technologie (multimodal nanoprobe) stelt ons in staat uniek inzicht te verkrijgen in de bio-distributie door het lichaam, de fate van de toegediende stamcellen en de effecten die de stamcellen hebben op hun omringende cellen na homing. De informatie is essentieel om de werkingsmechanismen van stamcellen verder op te helderen, meer inzicht te verschaffen in de hoeveel cellen die we aan patiënten moeten geven en evt. bijwerkingen nauwkeurig in kaart te brengen.

##### d. De 5.1 lid2h vraagt zich af of het niet beter is de specifieke doelen anders in te steken?

Op basis van de gegevens uit ons consortium hebben wij besloten om de objectives aan te passen en objectives 2a en 2b niet uit te gaan voeren. Hierdoor wordt het aantal experimentele groepen en daarmee benodigde dieren substantieel gereduceerd.

De objectives zijn nu als volgt:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess therapeutic efficacy of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

Alle wijziging zijn ook doorgevoerd en grijs gearceerd in sectie 3.2 van het projectvoorstel, sectie A van appendix 1 (inclusief een berekening van het aantal benodigde dieren).



### 3.3 Belang

8. **In uw projectvoorstel worden lammeren geboren rond dag 120 van de zwangerschap wat bij een draagtijd van ~147 dagen voor het schaap, vertaalt naar ongeveer 32 weken bij de mens. Het lijkt daarmee niet te gaan om een model voor extreem vroeggeboren kinderen. De 5.1 lid2h heeft de volgende vragen:**

a. **Wat modelleert u nu eigenlijk exact?**

Het model zoals beschreven in het projectvoorstel en appendix 1 betreft een 'multiple hit model' dat 3 essentiële elementen die vaak ten grondslag liggen aan (hersens)schade in vroeggeborenen combineren. Deze elementen zijn:

- 1) Antenatale inflammatie (chorioamnionitis): Antenatale inflammatie wordt in ons model geïnduceerd door intra-amniotische blootstelling aan LPS. Deze blootstelling resulteert in een foetale systemische pro-inflammatoire immuunreactie en inflammatie op orgaaniveau. Inflammatie op orgaaniveau heeft onderontwikkeling en schade tot gevolg.
- 2) Vroeggeboorte: vroeggeboorte (132 dagen zwangerschapsduur) is een essentieel onderdeel omdat dit de immaturiteit op het moment van geboorte, ongeacht preexistente inflammatie en schade, een oorzaak is van schade/dysfunctie op latere leeftijd.
- 3) Postnatale inflammatoire (ontstekings-) stress: Premature kinderen hebben vaak intensieve zorg nodig om een neonatale intensive care unit (NICU). Deze zorg bestaat onder anderen uit ademhalingsondersteuning. Intensieve zorg is vaak essentieel voor de overlevingskans van het kind, maar brengt ook gezondheidsrisico's met zich mee. Mechanische beademing verhoogt namelijk het risico op long- en breinschade. Deze schade wordt vaak veroorzaakt vanwege een inflammatoire reactie. In combinatie met een immatuur immuunsysteem leiden deze medische interventies vaak tot additionele schade bovenop de reeds ontstane schade door de antenatale infectie/inflammatie.

b. **Betreft dit een model voor prenatale inflammatie, chorioamnionitis en/of preterm delivery?**

Zoals reeds beschreven in het antwoord op vraag 8a betreft dit een multiple hit model waarin antenatale infectie/inflammatie (chorioamnionitis), vroeggeboorte en postnatale ontstekingsstress d.m.v. mechanische beademing worden gecombineerd.

c. **En op welke subgroep van extreme/very/moderate to late preterm delivery heeft uw project hierbij betrekking?**

Ons project heeft betrekking op 'moderate to late preterm' geboren kinderen. Dit omvat 80% van alle vroeggeboren kinderen (bron: Perined, 2021; [www.perined.nl](http://www.perined.nl)).

d. **In de beschrijving van het belang betreft u de groepen "extreme preterm en very preterm (<32 weken) geboren kinderen die niet door uw model gemodelleerd lijken te worden. Kunt u opnieuw reflecteren op het belang van uw project als deze groep kinderen niet meegenomen wordt in uw diermodel?**

Bij de ethische vraagstukken rondom de grens van levensvatbaarheid en extreme vroeggeboorte speelt dierexperimenteel onderzoek een zeer beperkte rol. Anders gezegd, dierexperimenteel onderzoek is niet de drijvende kracht achter de verschuiving van de grens van levensvatbaarheid, maar eerder een reactie om deze kinderen een optimale kans te geven. Het is uiteraard wel onvermijdelijk dat de vooruitgang in perinatale zorg, die dus deels door dierexperimenteel onderzoek gestimuleerd is, gepaard gaat met een verschuiving van de grens van levensvatbaarheid. In dit kader is het niet ondenkbaar dat de resultaten die geboekt worden in het voorgestelde project, geëxtrapoleerd kunnen worden naar de extreem vroeggeborenen.

### 3.4 Strategie

#### 3.4.1 Overzicht algemene projectvoorstel

9. In uw inleiding beschrijft u dat zowel toedieningsroute (iv/in) als timing van de behandeling met SC's ertoe doen. Vervolgens stelt u een experiment voor waarin u een interactief effect van toediening en timing gaat onderzoeken, maar u neemt niet alle experimentele groepen mee in uw design.

a. De 5.1 lid2h mist onderbouwing voor uw specifieke keuze voor alleen vroege iv toediening, alleen late IN toediening en de combinatie van de twee. Waarom kunt volstaan met alleen deze groepen en hoeft IN toediening niet vroeg en IV toediening niet laat gemeten te worden?

Zoals reeds beschreven in vraag 7 zijn onze behandelstrategieën gebaseerd op voorwerk verricht in knaagdieren door partners uit het PREMSTEM-consortium. Uit dit werk is heel evident naar voren gekomen dat met name de late intranasale stamcel gift neuro-protectief werkte. Daarnaast heeft het voorwerk verricht door ons laboratorium en dat van collega's aangetoond dat een intraveneuze toediening van stamcellen binnen 24-48 uur na vroeggeboorte beschermend werkt voor brein en andere orgaansystemen waaronder de long.

Gebaseerd op deze gegevens hebben wij besloten om de voorgestelde objectives aan te passen en alleen de korte termijneffecten van een 'vroeg' intraveneuze en de lange termijneffecten van een gecombineerde 'vroeg' intraveneuze en 'late' intranasale stamcelgift te toetsen.

b. De 5.1 lid2h vraagt zich af wat de toegevoegde waarde is van de korte-termijn studie, aangezien efficiëntie ook wordt nagegaan via longitudinale opvolging voor de lange-termijn studie.

Het unieke aspecten van deze studie is het maken van correlaten tussen functionele, histologische en cellulaire parameters. Dit totaalpakket biedt essentiële mechanistische inzichten in het ontstaan van brein pathologieën na vroeggeboorte/perinatale ontstekingsstress en de effecten van de therapie. Dit pakket berust voor een deel op postmortale analyses op zowel de korte en lange termijntekorten. In deze context is het goed mogelijk dat (met name) functionele verschillen (geheugen, looppatronen) tussen behandelde en niet behandelde dieren pas evident worden op de lange termijn terwijl de mechanistische/moleculaire grondslag juist op de korte termijn zichtbaar is.

c. Zou het niet ook van belang zijn om een migration study bij de intranasale toediening uit te voeren? Bijv. bij gezonde dieren? Zorgt hersenbeschadiging ervoor dat de stamcellen naar de hersenen migreren?

Een migration study met intranasale toediening van stamcellen gelabeld met multimodal nanoprobe is reeds uitgevoerd in een knaagdiermodel (Vaes, J.E., et al., *Glia*, 2021. **69**(3): p. 655-680)). Intranasale toediening is gebaseerd op migratie van stamcellen naar hersengebieden met schade. Derhalve kan migratie niet in gezonde dieren worden getoetst. In de voorgestelde schapenstudie zullen wij stamcellen toedienen op 2 maanden postnataal. De dosering stamcellen (berekend per kg lichaamsgewicht) zal logischerwijs hoger zijn op deze leeftijd. Echter de grootte van het schaap en daarmee de organen zijn een limiterende factor om intranasale toediening in schapen te toetsen.

d. De argumentatie achter vroeg ingrijpen is evident. De 5.1 lid2h mist echter de bewijsvoering/onderbouwing op basis waarvan u kiest voor een insteek met een behandeling op een leeftijd van twee maanden en de gekozen read-outs op 8 en 12 maanden.

Op basis van gegevens uit het PREMSTEM-consortium is gekozen voor intranasale toediening van stamcellen op 2 maanden postnataal. Voor het bepalen van read-outs op 12 maanden (einde experiment) is gekozen om dat schapen na 1 jaar qua leeftijd in mensen het equivalent van een jongvolwassene hebben bereikt en we dus de meest cruciale levensfasen m.b.t. hersenontwikkeling meenemen in het experiment. Een extra meetmoment op 8 maanden is gekozen omdat training van de dieren voor functionele read-outs enige tijd vergt. Het is relatief moeilijk in te schatten hoe snel de dieren voldoende getraind zijn, maar het kan goed zijn dat deze read-outs eerder gemeten zullen worden als blijkt dat training op jonge leeftijd succesvol is.

Wij hebben dit ook als een milestone opgenomen in sectie 3.4

10. De **5.1 lid2h** vraagt zich af hoe een geplande keizersnede zoals in de beoogde opzet te vergelijken is met een door de omstandigheden opgelegde keizersnede bij vroeggeboorte.

Vroeggeboorte voortkomend uit een chorioamnionitis bij mensen zijn in de meeste gevallen spontane vaginale bevallingen. In het geval van foetale nood zal een (nood) keizersnede worden uitgevoerd, in de gecontroleerde omgeving van ons experiment bootsen wij deze noodsituatie niet na. Echter, in schapen is het opwekken van een 'spontane' vaginale geboorte zeer gecompliceerd en risicovol:

- 1) De foetale lammeren zijn voorzien van vasculaire lijnen, waaronder een arteriële lijn. Tijdens een vaginale bevalling is het risico dat deze lijn niet meer in situ is zeer groot en daarmee het risico op een arteriële bloeding en foetale dood sterk verhoogd.
- 2) Foetale lijnen worden door de baarmoederwand en maternale buikwand (flank) naar buiten geleid. Het risico dat er grote tractie op de lijnen komt te staan, gepaard gaande met pijn en eventuele bloedingen is groot. Daarnaast moeten de lijnen na de bevalling verwijderd worden en moet de baarmoeder en buikwand worden hersteld.
- 3) Lammeren zijn ten tijde van de bevalling al dermate groot dat het risico op dystocia ook vergroot is. Derhalve hebben wij ervoor gekozen om vroeggeboorte middels keizersnede plaats te laten vinden. Zoals standard clinical practice zullen in het voorgestelde experiment de oaien 24 uur voor de keizersnede een injectie met corticosteroiden krijgen, ter bevordering van de foetale longrijping.

11. U baseert uw werk in schapen op dat in knaagdieren.

- a. **Blijkbaar worden er (parallel) ook efficacy studies in knaagdieren gedaan. Kunt u dat beter toelichten? Waarom is dat nodig of, anders gezegd, in hoeverre zijn die studies bepalend voor wat er in deze schapenstudie gaat gebeuren?**

Onze behandel paradigma's zijn inderdaad gebaseerd op studies in knaagdieren. Deze 'efficacy' studies omvatten een grote matrix waarin verschillende doseringen worden getoetst in relatie tot het tijdstip van en route van toediening. Daarnaast omvatten deze experimenten meerdere knaagdiermodellen voor EoP. Een belangrijke reden om deze experimenten in knaagdieren uit te voeren is dat het niet haalbaar is om deze experimenten uit te voeren in andere proefdieren zoals schapen.

- b. **In uw consortium gaat u humane Mesenchymale stamcellen uit de navelstreng valideren. U geeft in de inleiding aan dat allogene therapie mogelijk is dankzij de afwezigheid van MHC-class 2 complexen. Zijn dergelijke stamcellen afkomstig van een andere species (mens) ook bruikbaar in de preklinische knaagdier modellen en in uw eigen preklinische schapen model?**

Meerdere ondergroeps groepen, waaronder onze groep, hebben humane mesenchymale stamcellen van verschillende bronnen succesvol getoetst in knaagdiermodellen en preklinische schapenmodellen zonder dat deze cellen een afweerreactie veroorzaakten. Tevens zijn de stamcellen die in het schapenmodel ook uitvoerig getoetst in het voorwerk in knaagdiermodellen.

- 1) Jellema, R.K., et al., PLoS one, 2013. **8**(8): p. e73031.
- 2) Gussenhoven, R., et al., 2018. **15**(1): p. 113.
- 3) Jellema, R.K., et al., Journal of neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 241.
- 4) McDonald, C.A., et al., International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(10): p. 2449.
- 5) Tanaka, E., et al., Frontiers in neurology, 2018. **9**: p. 133

- c. **De hersenontwikkeling (en dan met name diens timing) in knaagdieren in relatie tot de zwangerschap is echter compleet verschillend in vergelijking met schapen en mensen. De DEC-UM mist de argumentatie op basis waarvan u vertrouwt op dit voorwerk.**

Voor het nabootsen van bepaalde onderdelen van hersenschade achten wij knaagdiermodellen geschikt. Echter, zoals aangegeven in vraag 4, is het gebruik van schapen voor de bevestiging en uitbreiding van de knaagdierdata essentieel alvorens over te stappen naar de mens en kinderen in het bijzonder.

- d. De **5.1 lid2h** vraagt zich af hoe een geplande keizersnede zoals in de beoogde opzet te vergelijken is met een door de omstandigheden opgelegde keizersnede bij vroeggeboorte.

Zie antwoord vraag 10

- e. **U definieert alleen een Go moment voor de start van het hele experiment, nl een succesvolle dose finding in knaagdieren. Zijn gevonden doses van humane cellen in knaagdieren ook te transleren naar schapen?**

Onze behandel paradigma's zijn gebaseerd op studies in knaagdieren. Deze 'efficacy' studies omvatten een grote matrix waarin verschillende doseringen worden getoetst in relatie tot het tijdstip van en route van toediening. Daarnaast omvatten deze experimenten meerdere knaagdiermodellen voor EoP. Een belangrijke reden om deze experimenten in knaagdieren uit te voeren is dat het niet haalbaar is om deze experimenten uit te voeren in andere proefdieren zoals schapen. Wij zijn ervan overtuigd dat de doseringen die worden gevonden in de knaagdiermodellen transleerbaar naar schapen zijn. De eerste resultaten laten zien dat een dosering van ongeveer 5 miljoen cellen/kg lichaamsgewicht voldoende efficacy geeft. Deze dosering in range met voorgaande studies in die wij in schapen hebben uitgevoerd 2-3 miljoen cellen/kg en waarin we therapeutische efficacy hebben aangetoond (Jellema, R.K., et al., PLoS one, 2013. **8**(8): p. e73031 & Jellema, R.K., et al., Journal of neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 241.)

- 12. Zou het niet ook van belang zijn om een migration study bij de intranasale toediening uit te voeren? Bijv. bij gezonde dieren? Zorgt hersenbeschadiging ervoor dat de stamcellen naar de hersenen migreren?**

Een migration study met intranasale toediening van stamcellen gelabeld met multimodal nanoprobe is reeds uitgevoerd in een knaagdiermodel (Vaes, J.E., et al., Glia, 2021. **69**(3): p. 655-680)). Intranasale toediening is gebaseerd op migratie van stamcellen naar hersengebieden met schade. Derhalve kan migratie niet in gezonde dieren worden getoetst. In de voorgestelde schapenstudie zullen wij stamcellen toedienen op 2 maanden postnataal. De dosering stamcellen (berekend per kg lichaamsgewicht) zal logischerwijs hoger zijn op deze leeftijd. Echter de grootte van het schaap en daarmee de organen zijn een limiterende factor om intranasale toediening in schapen te toetsen.

- 13. Het lijkt logisch om een go/no go momenten te definiëren tussen de short term treatment en de longterm treatment. Als er geen meetbare effecten van de short term treatment zijn lijkt het weinig zinvol om op de lange termijn te kijken, of de combinatie van lang en kort uit te voeren. Wat is hierop uw visie?**

Een gedeelte van de gevolgen van hersenschade wordt vaak pas evident op latere leeftijd. Het is goed mogelijk dat verschillen, waaronder problemen met het geheugen en de motoriek (looppatronen), tussen behandelde en niet behandelde dieren pas evident worden op de lange termijn terwijl de mechanistische/moleculaire grondslag voor deze verschillen juist op de korte termijn zichtbaar is.

## Appendix 1

### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

14. **U heeft uitgebreid aandacht voor het beschrijven van de procedures m.b.t. het pre-term model. DE 5.1 lid2h mist echter een (korte) beschrijving/motivatie van de meeste andere experimentele procedures zoals: de MRI-scans, de EEG-meting en de gait en geheugentesten. Meer informatie is voor de 5.1 lid2h nodig om te kunnen afwegen of het ongerief goed is ingeschat en of het in relatie staat tot de te verwachten opbrengsten. Op dit moment roept de summier beschrijving van deze procedures vragen op zoals:**

- a. **Hoe (en waarom) wordt EEG gemeten. EEG is niet opgenomen als primaire uitkomstmaat, maar heeft in potentie wel grote gevolgen voor het ongerief. Worden er permanente elektroden in de schedel aangebracht (zoals bij knaagdieren), of worden afleidingen op de kop gelijmd, of wordt er met een cap systeem gemeten? Hoe lang duren de metingen, wordt een zender of kabelsysteem gebruikt dat de bewegingsvrijheid van de dieren beperkt, of worden de metingen wellicht gecombineerd met de MRI-scan waardoor nauwelijks extra ongerief optreedt?**

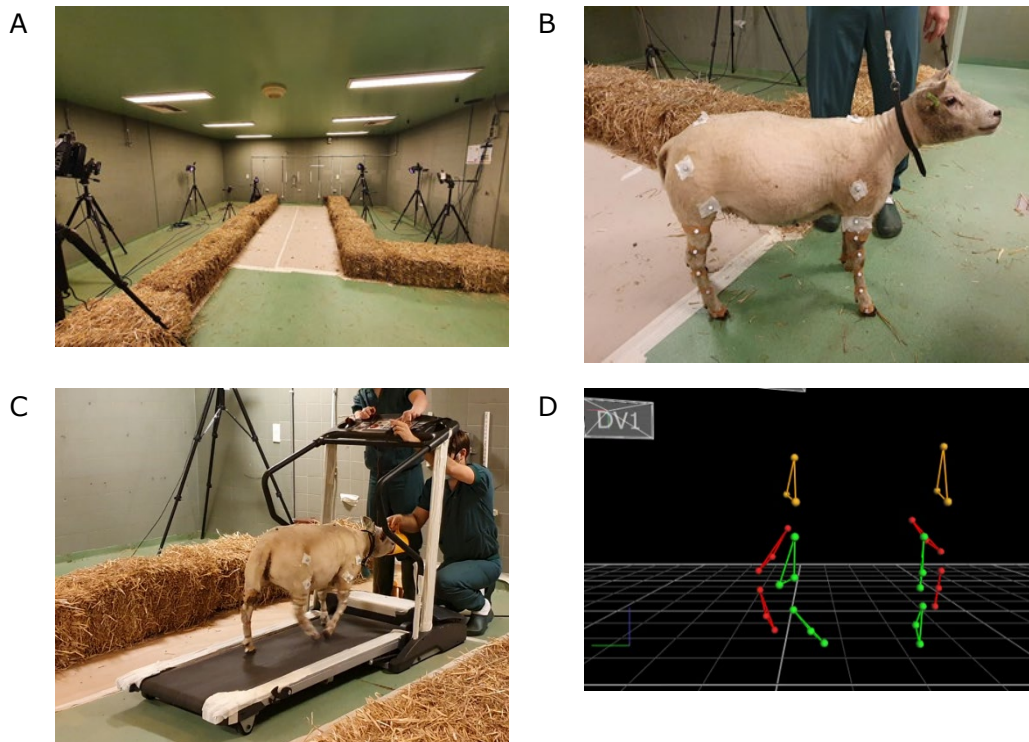
EEG zal worden gemeten middel subcutane naaldelektrodes die ook gebruikt worden bij vroeggeboren kinderen in de kliniek. Deze naaldelektrodes worden kort na de keizersnede geplaatst, voordat het lam wakker is en zullen tijdens de 72 uur beademingsperiode in situ blijven voor continue metingen. De elektrodes zijn middels kabels gekoppeld aan een meetsysteem. De bewegingsvrijheid van de lammeren in de hangmat wordt door de kabels niet belemmerd. In de lange termijn studie zullen de EEG-signalen worden verzameld tijdens de periode dat het schaap onder anesthesie voor MRI-scans. Door EEG te meten tijdens de periode op de LICU en gedurende anesthesie voor MRI zal het ongerief beperkt zijn.

- b. **Welke informatie verwachten de onderzoekers van de MR-beeldvorming? Functionele versus anatomische informatie vergt verschillende types van MR-beeldvorming.**

Wij gebruiken geavanceerde MRI-technieken om structurele schade zeer gedetailleerd in beeld te brengen. De MRI-parameters (T1, T2, DWI, DTI, GRASE) die we gebruiken zijn in klinische studies zeer sterk gecorreleerd met functionele neurologische ontwikkeling op latere leeftijd. Het functioneren van de hersenen wordt in de neonatale fase wel gemeten middels EEG. En op latere leeftijd bestuderen we de functionele ontwikkeling middels analyse van het gangbeeld (gait) en cognitieve tests (maze). Alhoewel fMRI interessant zou zijn, is er in dit projectvoorstel dus geen behoefte aan deze uitkomstparameter.

- c. **U gaat op 8 en 12 maanden leeftijd de lammetjes een gait test en een maze latendoen. Kunt u de procedure van de testen kort beschrijven. Wat is de reden dat u daar pas op 8 maanden mee begint? Heeft u hier ervaring mee? Waar gaat u precies op scores?**

Gait analyse: Wij hebben gait analyse reeds succesvol toegepast bij onze lammeren/schapen. Gait analyse wordt uitgevoerd in samenwerking met collega's van de afdeling bewegingswetenschappen en vindt plaats in een stal op de centrale proefdiervoorziening die uitgerust is met een speciale cameraopstelling gericht op een looppad waarover de schapen op en neer lopen onder begeleiding van een onderzoeker (fig. 1A). Voor deze procedure worden de schapen aangeliend, hetgeen van tevoren getraind moet worden. Tijdens de gang over het looppad filmen de camera's reflectoren die op strategische plekken (gewrichten) op het schaap zijn aangebracht (fig. 1B). Ook zullen de schapen op een loopband lopen met afwisselende snelheid (fig. 1C). Door de snelheid af te wisselen worden afwijkende looppatronen vaak nog evidentier. Lopen op een loopband dient ook getraind te worden. In figuur 1D wordt een bewerkt beeld weergegeven van de reflectoren op het schaap. Gait analyse maakt het mogelijk om bewegingspatronen en stoornissen in getal en maat uit te drukken.



**Figuur 1: Overzicht van gait analyse uitgevoerd op schapen.** A. Schapen worden over een loopband begeleid dat uitgerust met een cameraopstelling; B. Schapen worden voorzien van reflectors die opgepikt worden door het camerasysteem; C. Schapen zullen op een loopband lopen met verschillende snelheden; D. Voorbeeld van een camerabeeld.

Mazen testing bevindt zich op dit moment nog in de ontwikkelfase. Met hulp van internationale collega's met ervaring in maze testing in knaagdieren en schapen willen wij deze techniek implementeren in onze lange termijn experimenten. Wij hebben Maze testing als milestone en Go no-GO-moment toegevoegd aan sectie 3.4 van het projectvoorstel.

d. **Traint u de dieren voor bv het wennen/meewerken aan bloedafname en MRI en demotorische en cognitieve testen? Dit kan stress en daarmee ongerief reduceren.**

Voor motorische en cognitieve testen worden de inderdaad getraind. Training is voor de testen zelfs essentieel. De schapen worden niet getraind voor bloedafname. Het meest stressvolle element bij bloedafnames is het vangen en fixeren van dieren en vergt training van dieren en personeel. Deze handelingen worden derhalve ook alleen uitgevoerd door specifieke personen in onze onderzoeksgroep en binnen de centrale proefdiervoorziening. Daarnaast zullen de maandelijkse bloedafnames plaatsvinden op de buitenlocatie (buitenstal) van de centrale proefdiervoorziening zodat geen onnodig transport en daarmee gepaard gaande stress veroorzaakt wordt. Ook zullen de schapen zullen 24 uur vóór de bloedafname apart worden gezet (groepshuisvesting) zodat de stress van het vangen gereduceerd is.

e. **Gebeurt de toediening van de IN stamcellen op 2 maanden leeftijd van delammetjes onder anesthesie?**

De intranasale toediening van de stamcellen zal gebeuren onder algehele anesthesie nadat de MRI-scan is uitgevoerd.

15. Het is voor de **5.1 lid2h** niet helemaal duidelijk wat het verschil in instrumentatie tussen deshort term en de long-term groep is. Het lijkt alsof de ooien in de lange-termijn groep weleen canule in de vruchtwaterholte krijgen. Klopt dit? Zo ja,

a. **Waarom is hiervoor gekozen? Is het ook mogelijk om LPS/ Saline toe te dienen met een injectie zonder deze canulatie? Dit zou het ongerief voor de dieren verlagen.**

In de korte termijn studies zullen wij vasculaire lijnen (veneus en arterieel) omdat deze de mogelijkheid geven om bloed af te nemen en essentiële immuun-parameters te meten die mechanistisch inzicht geven in de immuunreactie na LPS-blootstelling (plasma en PBMCs).

In de long-term groep is ervoor gekozen om geen vasculaire katheters te implanteren tijdens de foetale instrumentatie omdat de zou kunnen leiden tot ischemie en daardoor onderontwikkeling van de achterpoot, hetgeen een confounder is voor onze uitkomstmaten (GAIT). Ook de veneuze lijn zullen wij niet plaatsen omdat deze uiteindelijk verwijderd dient te worden in de 1-jaars dieren, hetgeen additioneel ongerief is omdat dit chirurgisch plaats zou moeten vinden. Daarnaast is een dergelijke chirurgische ingreep een additioneel risico op infecties. In deze dieren zullen de lijnen tijdens de keizersnede worden aangebracht in de navelstrengarterie en in een vene van de achterpoot middels een minimaal invasief geplaatste centraal veneuze katheter.

In de lange termijn en de korte termijn studies dienen wij de LPS toe via een intra-amniotische katheter om de volgende reden:

Injectie van LPS middel een echogeleide injectie heeft in een vorig cohort tot zeer grote uitvalspercentages geleid (>90%), gekenmerkt door foetale dood en spontane abortus. Toediening van LPS middels een chirurgisch aangebrachte katheter heeft dit risico verlaagd naar 10%.

b. **Zou het daarmee mogelijk zijn om de ooien in de controlegroep niet te hoeven doden, en aan te bieden voor adoptie. In de veehouderij komt een keizersnede ook regelmatig voor en is dat niet per sé een reden om een ooi te doden.**

De lammeren worden preterm via keizersnede geboren. De keizersnede zelf gebeurt onder volledige anesthesie. Voor de ooi zelf betekent dit gering ongerief. Indien de ooi moet bijkomen uit anesthesie en herstellen van de keizersnede, zal ze meer ongerief ondervinden: minimaal matig de eerste dagen na de ingreep gradueel afnemend naar gering tot volledig herstel. Daarnaast zal tijdens de keizersnede ook de alle wonden t.g.v. de instrumentatie (uittredeplaatsen katheters in baarmoeder en flank) moeten worden hersteld. Daarbij is het risico op complicaties na keizersnede voor de ooi verhoogd, met name omdat de keizersnede gebeurt op een moment dat de ooi nog niet in partus is (vroeggeboorte) en dus baarmoeder en placentomen (cotyledonen) ook nog dysmatuur zijn. Hierdoor kan de nageboorte blijven staan, met als gevolgen een baarmoederontsteking. Hierdoor kan de herstelperiode na operatie verlengd zijn met langer en hoger ongerief voor het dier.

Een ander aspect is de vraag wat met de ooien zou gebeuren als ze in leven gelaten worden en het herstel van de operatie hebben doorgemaakt. Hergebruik in een ander experiment zou opnieuw lijden tot ongerief. Op dit moment zijn er ook geen lopende onderzoeken in volwassen schapen in onze instelling. Uit eerdere ervaring uit ons onderzoeksgroep heeft de net doorgemaakte zwangerschap ook invloed op een aantal fysiologische parameters. Bij voorbeeld veranderen tijdens de zwangerschap de longen en het cardiovasculair stelsel. Het gebruik van deze dieren in een studie samen met niet zwangere dieren wordt daardoor wel beperkt. Om wel gebruik te maken van de dieren hebben wij in de afgelopen jaren regelmatig lichaamsmateriaal van opgeofferd ooien aangeboden aan andere laboratoria. Op die manier kunnen zij hun lab technieken testen en verfijnen, waardoor de kwaliteit van onderzoek in schapen in de toekomst verbeterd wordt. Verder wordt met lichaamsmateriaal in vitro werk op bepaalde vraagstellingen gedaan, zonder dat extra proefdieren nodig zijn.

Samenvattend, zijn wij daarom van mening dat het bijkomende vermijdbaar ongerief voor het dier zwaarder weegt dan het doel het dier voor een onzekere toekomst in leven te houden.

**16. Wat is de noodzaak van alle controle groepen? Wat wordt er verwacht van SC-toediening bij controledieren? Kunnen er geen historische controles gebruikt worden als referentie voor LPS-behandeling? Voldoet een controle-sham groep niet. Dit zou veel dieren besparen.**

Voor de korte termijn studie maken wij gebruik van 4 groepen, te weten een controle-sham, controle-SC, LPS-sham en LPS-SC groep. De controle-sham groep is essentieel om het fenotype en het behandel-effect te bepalen. Wij zullen voor de LPS-sham groep geen gebruik maken van historische controles omdat deze controles niet voldoen aan de beademings-strategieën zoals deze nu toegepast zullen worden in onze experimenten. Omdat vroeggeboren zonder chorioamnionitis ook hersenschade kunnen ontwikkelen in combinatie met mechanische beademing, zullen wij deze groep ook toetsen in onze studie.

**17. Zijn lammetjes die a term geboren worden en door de moeder worden grootgebracht een goede /optimale controle? De experimentele groep wordt én te vroeg geboren, én groeit op zonder moeder. Voor de 5.1 lid2h klinkt dit als een dubbel nadeel/dubbele stress voor het gezond (op)groeien van de lammetjes. Zou het op een of andere manier mogelijk zijn om de te vroeggeboren lammetjes ook bij een/hun moeder op te laten groeien? Creëert dit geen confounder m.b.t. ontwikkeling?**

Het is helaas niet mogelijk om de vroeggeboren lammeren op te laten groeien bij een (surrogaat) moeder omdat de periode tussen geboorte en hereniging te lang is en de ooi het lam zal verstoten. Daarnaast zijn vroeggeboren lammeren zeer gevoelig voor infecties/ziekten die een ooi van nature bij zich draagt. Op basis van ervaring met lange termijn studies in schapen door onze en andere groepen zijn wij ervan overtuigd dat moederloze opfok geen confounder is in het experiment.

**18. U verwacht bij de lange-termijn experimenten voor de dieren die a term op een natuurlijkemanier geboren worden en door de moeder worden grootgebracht 30% uitval. Wat is de reden dat dit zo hoog is?**

De 5.1 lid2h heeft een valide punt. De bevalling van schapen is een natuurlijk fysiologisch proces. Schapen lammeren meestal spontaan af met weinig problemen. Soms is hulp nodig bij afwijkende ligging van de lammeren of slechte ontsluiting. Gespierde vleesrassen (zoals de Texelaar) hebben vaker moeite met aflammeren t.o.v. andere rassen. Daarom worden de ooiën rond de partus intensief opgevolgd zodat er tijdig ingegrepen kan worden door een dierenarts. Indien nodig wordt er een keizersnede uitgevoerd. Tot op heden heeft onze onderzoeksgroep geen uitval hebt gehad bij à terme geboorte van gezonde lammeren. Derhalve is het geschatte uitvalspercentage (5%) van lammeren die à term worden geboren is lager dan de reeds 30% zoals beschreven in appendix 1. Wij hebben deze drop-out percentages meegenomen in de (her)berekening van de dieraantallen

**19. Worden er andere SC toegediend voor cell-tracing studies (multimodal NPs)? Waarom worden deze ook niet toegediend bij doelstelling 1 en 2, waardoor beide onderdelen simultaan kunnen uitgevoerd worden.**

Toediening van stamcellen gelabeld met multimodal nanoprobe zal grotendeels worden uitgevoerd in dieren die ook voor doelstelling 1 (short-term survival) worden gebruikt. Dit hebben wij ook als dusdanig beschreven en resulteert in een reductie van 30 dieren. De 12-uurs experimenten zullen niet worden uitgevoerd in de dieren uit doelstelling 1 en 2 omdat deze duur van deze experimenten (72 uur) langer is.

**20. Kunt u (kort) toelichten hoe de SC worden gegenereerd en (eventueel) worden opgeslagen?**

De SCs (umbilical cord-derived MSC) worden door een consortiumspartner (farmaceutisch bedrijf) aan ons geleverd. Tot aan gebruik worden de cellen opgeslagen in vloeibare N<sub>2</sub>. 48 uur voor gebruik worden de cellen onder steriele omstandigheden ontdooid en in kweek gebracht voor één passage. 1 uur voor toediening worden de cellen geogost en worden de cellen meermaals gewassen. Op basis van het gewicht van het lam bij geboorte wordt de correcte hoeveel cellen in een steriele zoutoplossing gebracht en in een injectie spuit opgenomen.



**21. In welke mate zijn de korte-termijn en de lange-termijn studie vergelijkbaar qua SC efficiëntie bepaling? Beide studies lijken een andere experimentele opzet te hebben (arterial and venous catheters, catheter in amniotic cavity)**

De experimentele opzet van beide experimenten hetzelfde. Alle dieren in de korte en lange termijnstudies krijgen een intra-amniotische katheter waardoor LPS of steriel zout (sham) zal worden toegediend. Het plaatsen van vasculaire katheters gedurende foetale instrumentatie heeft geen effect op de effecten van LPS. De procedures op de lamb intensive care unit zijn volledig uitwisselbaar tot het moment waarop de korte termijn lammeren opgeofferd worden en de lange termijn lammeren hun traject zullen vervolgen. De moleculaire analyses om de efficiëntie van stamcel therapie te bepalen zullen gelijk zijn, Echter, in de lange termijn studie zullen deze analyses met functionele read-outs en imaging worden uitgebreid.

**22. U geeft aan colostrum te voeren aan de te vroeggeboren lammeren. Omdat u de ooi euthanaseerd verkrijgt u die niet van de moeder. Wat is de bron van het colostrum, heeft u daar extra dieren voor nodig?**

Wij zullen alle ooiën vóór de keizersnede melken en dit colostrum zal worden opgeslagen in onze colostrum bank. Daarnaast voeren wij deze procedure uit bij alle zwangere schapen, inclusief zwangere schapen uit andere experimenten. In het geval er geen colostrum aanwezig is, hebben wij een colostrum bank aangelegd waaruit colostrum genomen kan worden. Ook hebben wij de beschikking over kunstmatig colostrum. Wij streven ernaar om de eerste colostrum te voeren omdat de darm barrière in deze periode nog permeabel is voor antistoffen die zich in het colostrum bevinden. Na deze periode zullen wij over gaan op lammerenmelk. Wij zijn samen met de centrale proefdienvoorziening ook op zoek naar externe bronnen van colostrum. Echter, de beschikbaarheid is gelimiteerd en de gezondheidsstatus van externe boerderijen is hierbij een limiterende factor.

**B. Dieren**

**23. Prenatale stress is zoals u zelf al aangeeft ook van invloed op de hersenontwikkeling en kan vergelijkbare effecten hebben als chorioamnionitis. Waarom kiest u er dan voor elders zwangere schapen te bestellen en deze zwanger te transporteren en in een geheel nieuwe omgeving te plaatsen? Volgens de 5.1 lid2h zou dit grote invloed op de uitkomsten van uw studie kunnen hebben. In hoeverre is fok op 5.1 lid2h een probleem? Waarom wordt hier niet voor gekozen? Dit zou zowel dierenleed besparen als mede uw power verhogen (controles nu ook 'echte' controles).**

Binnen de huidige infrastructuur binnen van de centrale proefdienvoorziening van de UM is fok van schapen op locatie niet mogelijk. Fok in eigen beheer biedt inderdaad een aantal voordelen, maar het opzetten, in stand houden van een kudde schapen en de fokprocedure vereist zeer veel expertise die niet aanwezig is op de UM. Derhalve zijn wij genoodzaakt om drachtige ooiën van een extern fokbedrijf naar 5.1 lid2h te transporteren en accepteren dat dit transport eventueel met stress gepaard kan gaan. Echter, wij streven ernaar om stress zo laag mogelijk te houden door meerdere schapen tegelijk op transport naar 5.1 lid2h te laten komen zodat er een kudde gevoel blijft. Daarnaast worden de schapen ruim voordat ze zullen bevallen of in experiment zullen gaan naar 5.1 lid2h getransporteerd.

**24. Belangrijke uitkomstmaten zijn inflammatoire status en neuroinflammatie. U geeft aan foetussen in utero te cannuleren. Deze chirurgische procedure zelf zal net als LPS waarschijnlijk ook inflammatie en prenatale stress veroorzaken. Hoe schat u het effect van de procedure in t.o.v. de LPS-toediening?**

Prenatale stress zoals geïnduceerd door LPS in de voorgestelde experimenten leidt tot een systemische immuun response genaamd FIRS (fetal immune response syndrome). FIRS is geassocieerd met neonatale complicaties, waaronder hersenschade. FIRS wordt klinisch vastgesteld door bepaling van het gevoelige cytokine IL-6 in het plasma van de neonaat. In voorgaande experimenten in het model dat wij zullen gebruiken in de voorgestelde studie hebben wij na foetale instrumentatie, dagelijks foetale plasma IL-6 hoeveelheden bepaald. Wij hebben geobserveerd dat foetale instrumentatie niet leidt tot een verhoogd plasma IL-6. Na blootstelling aan LPS steeg het plasma IL-6 binnen 12 uur. Daarnaast zien wij in geïnstrumenteerde dieren geen afwijkingen ten opzichte van gestation-matched controls, zijnde dieren die opgeofferd zijn op dezelfde zwangerschapsduur, maar geen instrumentatie hebben ondergaan. Gebaseerd op deze observaties zijn wij ervan overtuigd dat de foetale instrumentatie niet zal interfereren met de inflammatoire reactie die veroorzaakt wordt door LPS.

25. **DE 5.1 lid2h kan uw poweranalyse voor de short-term postnatal survival groep niet reproduceren. effectsize  $F=0.51$ , alpha 0.05 en power 0.8 bij omnibus one-way ANOVA en 4 groepen geeft 48 (12) dieren per groep, dit is nog exclusief uitval. De 5.1 lid2h mist ook informatie over de condities waaronder en waar de microglia aantallen gemeten zijn in uw unpublished sheep work.**

De 5.1 lid2h heeft een valide punt. De correcte groepsgrootte voor het voorgestelde experiment is inderdaad  $n=12$  per groep zonder drop-out. Op basis van de geschatte drop-out van 20% is de totale groepsgrootte  $n=15$ . Dit houdt in dat het totaal aantal benodigde dieren voor de korte termijn  $n=60$  ooiën en  $n=60$  lammeren bedraagt. Wij hebben de vernieuwde powercalculatie toegevoegd aan appendix 1. Microglia aantallen zijn gemeten in het voorgestelde diermodel van perinatale ontstekingsstress (antenatale inflammatie, vroeggeboorte en postnatale beademing gedurende 72 uur) en een stamcel therapie. Microglia aantallen zijn gemeten in de periventriculaire witte stof die het meest gevoelig is voor inflammatie en waarin klinisch gezien ook inflammatie-geïnduceerde hypomyelinisatie plaatsvindt. Wij hebben dit ook in appendix 1 en de niet technische samenvatting aangepast.

26. **U schat 10 foetussen (dus inclusief ooiën 20 dieren per groep) nodig te hebben voor cell-tracing experimenten. Waarop is deze schatting gebaseerd?**

De aanvraag van 10 ooiën en 10 foetussen per experimentele groep voor de 12 uur bio-distributie studie hebben gedaan op basis van een ruwe schatting. Gebaseerd op de data van een studie van Vaes et al. (Vaes, J.E., et al., *Glia*, 2021. **69**(3): p. 655-680), waarin een significante migratie van gelabelde stamcellen naar het brein t.o.v. migratie naar andere organen werd geobserveerd 12 uur na toediening in  $n=6$  dieren per experimentele groep hebben wij het aantal dieren verlaagd naar 6. Met een verwachte drop-out van 10% is het aantal dieren per groep  $n=7$  ooiën en  $n=7$  lammeren.

Voor de 72-uurs cell-tracing maken wij gebruik van de dieren die ook voor de korte-termijn overleving ingepland staan. Hierdoor hebben wij geen extra dieren voor deze studie aangevraagd. Het aantal dieren is aangepast in appendix 1 en de niet-technische samenvatting.

27. **U baseert uw inschatting van de effectsize op aantallen microglia als schatting voor neuroinflammatie. In welk hersengebied? en op welk tijdstip in de ontwikkeling? en hoelang na een eventuele inflammatoire stressor (zie vraag 26)?**

**Microglia aantallen en activatie/priming zijn ook sterk afhankelijk van leeftijd (zie bijv PMC8133315). Is een power analyse o.b.v. deze uitkomstmaat wel een goede schatter voorde effecten van perinatale inflammatoire stress op de neuronale ontwikkeling? Op langere termijn (1 jaar)? Ook de huidige poweranalyse voor de lange termijn groep is met de gegeven informatie niet reproduceerbaar.** Microglia aantallen en activatie zijn inderdaad afhankelijk van levensstadia. Uit onderzoek is gebleken dat microglia activatie gedurende vroege levensfasen op latere leeftijd ( $< 1$  jaar) nog bij kan dragen aan het ontstaan van schade, meest waarschijnlijk door epigenetische veranderingen. Dit wordt de tertiaire fase van hersenschade genoemd (Fleiss, B., et al., *Lancet Neurol*, 2012. **11**(6): p. 556-66.). Deze epigenetische veranderingen en de effecten van stamceltherapie zullen in ons model ook verder worden onderzocht door postmortem microglia uit verschillende hersengebieden te isoleren voor gedetailleerd analyse. \_Op dit moment hebben wij nog geen data over structurele schade op de lange termijn in onze proefdiermodellen. Om deze reden hebben wij microglia activatie, zoals bepaald voor de korte termijn studie en sterk geassocieerd is met structurele en functionele schade, als uitkomstparameter genomen om de groepsgrootte te berekenen.\_Op basis van deze data en de herziene experimentele groepen, wordt het aantal dieren dat nodig is (5 groepen) bepaald op 55 ( $n=11$  per groep). Drop-out voor de groepen is als volgt:

Control-sham: 30%, aantal benodigde schapen  **$n=16$**

Control-SC: 30%, aantal benodigde schapen  **$n=16$**

LPS-sham: 35%, aantal benodigde schapen  **$n=17$**

LPS-SC: 35%, aantal benodigde schapen  **$n=17$**

À term geboren controles: 5%, aantal benodigde schapen  **$n=12$**

Op basis van deze berekening hebben we voor de lange-termijn studie 78 ooiën en 78 lammeren nodig. In totaal vragen wij 158 ooiën en 158 lammeren aan. Deze aantallen zijn aangepast in appendix 1 en de NTS.

**28. Kunt u uw hele hoge uitvalspercentages van 20-35% beter onderbouwen.**

De uitvalspercentages zijn gebaseerd op van vergelijkbare experimenten uitgevoerd door onze groep. In deze experimenten is gebleken dat de lammeren zeer gevoelig zijn voor sedatie (vraag 31) en infecties (vraag 32). De uitvalspercentages voor postnatale studies zijn over de laatste jaren gedaald door onder anderen verdere training van personeel door experts en wij voorspellen dat deze cijfers nog verder zullen dalen door de almaar groeiende kennis van het team en het toevoegen van medische professionals (inclusief kinderartsen en intensive care verpleegkundigen) en veterinaire professionals met schaap-specifieke expertise, aan het team.

**C. Huisvesting**

**29. U noemt bij een van de HEP's dat ooien op een bepaald moment niet individueel gehuisvest worden. Is er op enig moment tijdens het experiment wel sprake van afwijkende/ individuele huisvesting van de dieren? Wat zijn de gevolgen voor het ongerief?**

Alle ooien worden in groepen gehuisvest. Ooien die zullen bevallen van à terme controle lammeren zullen ten tijde van de bevalling apart gehuisvest worden tot 72 uur na de bevalling. Deze periode is nodig zodat de ooi in alle rust kan bevallen, de binding met haar lam goed en om te controleren dat het lam goed drinkt. Na 72 uur zullen de ooien en de lammeren in groepshuisvesting worden geplaatst. Dit hebben wij ook aangepast in appendix 1 sectie C.

**D. Pijn en welzijnsaantasting**

**30. Is het opgroeien zonder moeder voor de te vroeg geboren lammetjes niet ook een stressfactor?**

Indien we de lammeren weg zouden halen bij de moeder zou dit inderdaad een stressfactor zijn. Echter, de lammeren in het voorgestelde experiment hebben geen binding met een moeder waardoor ze dit niet als stress zullen ervaren. In voorgaande experimenten is gebleken dat de lammeren die moederloos grootgebracht worden zeer gefocust zijn op mensen. Om te voorkomen dat de lammeren stress ondervinden van het niet continu aanwezig zijn van mensen streven wij naar het houden van lammeren in groepen en minimaal menselijk contact.

**31. Het is onduidelijk of de lammetjes die aan de mechanische ventilatie liggen wakker zijn of onder anesthesie?**

De lammeren zullen tijdens mechanische ventilatie wakker zijn om de volgende reden:

In voorgaande experimenten waarin lammeren 72 uur beademd werden, zijn wij complicaties tegen gekomen die uiteindelijk hebben geleid tot een humaan eindpunt.

Deze complicaties waren als volgt: Na 48 uur maken alle lammeren een periode door die gekenmerkt wordt door (1) hypotensie; (2) capillary leakage en oedeem; (3) afwezigheid van maaglediging en (4) metabole acidose.

Wij hebben de beschreven complicaties besproken met Prof. Jane Pillow (University of Western Australia). Zij is expert in ventilatiemodellen en op basis van haar advies hebben wij de volgende aanpassingen succesvol doorgevoerd.

Door de houding van de lammeren te wijzigen van buik- en zijligging naar een buikligging in een hangmat met vrije beweeglijkheid van de poten in combinatie met **sedatievrije beademing** zal het lam in staat zijn om zelfstandig zijn bloeddruk en de complicaties gerelateerd aan bloeddrukschommelingen onder controle kunnen houden.

Door de lammeren tijdens de beademing niet te sederen hebben ze een zuigreflex waardoor ze actief gevoed kunnen worden, wat zal resulteren in adequate maaglediging en peristaltiek en daardoor preventie van o.a. metabole acidose. Daarnaast is peristaltiek en opname van o.a. antilichamen uit biest (colostrum) in de eerste 72 uren na de geboorte cruciaal voor de overlevingskans van lammeren, en vroeggeboren lammeren in het bijzonder.

**32. U wilt profylactisch antibiotica gaan gebruiken. Is dit een standaardprocedure en hoe verwacht u dat het uw experiment beïnvloedt, bijv. m.b.t. de interactie met inflammatie/neuroinflammatie.**

Op onze lamb intensive care unit voeren wij een strikt hygiëne en infectiepreventie beleid om eventuele infecties te voorkomen. Deze maatregelen bestaan uit persoonlijke hygiëne en beschermingsmaatregelen, desinfectiemaatregelen rondom vasculaire katheters en apparatuur/materiaal dat bij de schapen wordt gebruikt en het gebruik van disposable materialen. Deze maatregelen hebben wij reeds doorgevoerd onder op advies van verpleegkundigen en artsen die normaliter werkzaam op de neonatale intensive unit in de kliniek en heeft in een reductie van infecties geresulteerd. Echter, de lammeren blijven zeer gevoelig voor (subklinische) infecties waarvan de gevolgen in sommige gevallen (bijvoorbeeld artritis) pas na enkele dagen tot weken klinisch evident worden en alsnog leiden tot humane eindpunten. Door antibioticaprofylaxe te standaard toe te passen in combinatie met de eerder beschreven infectiepreventie maatregelen verlagen wij het infectierisico resulterend in een grotere overlevingskans op zowel de korte als lange termijn. In de dieren voor de lange termijn hebben wij ook een kweekinfrastructuur opgezet waarin alle vasculaire lijn (lijntips) onderzocht zullen worden door de afdeling microbiologie om zicht te houden op de infectiedruk en mogelijke resistentie.

### **E. Humane eindpunten**

**33. Als voor de in utero foetus een humaan eindpunt bereikt wordt, Betekent dit dan dat de ooi ook gedood wordt?**

Ja, indien een humaan eindpunt wordt bereikt door de geïnstrumenteerde foetus *in utero*, dan zal de ooi geëuthanaseerd worden. Foetale dood zal in de meeste gevallen leiden tot afrijven van de foetus. Dit proces veroorzaakt zeer veel ongerief bij de ooi, deels omdat de foetale vasculaire lijnen door de baarmoederwand via het maternale abdomen en door de maternale flank naar buiten zijn geleid. Indien we de ooi middels een keizersnede zouden verlossen van de overleden foetus, zou de ooi moet bijkomen uit anesthesie en herstellen van de keizersnede, en zal ze meer ongerief ondervinden: minimaal matig de eerste dagen na de ingreep geleidelijk afnemend naar gering tot volledig herstel. Daarnaast zal tijdens de keizersnede ook de alle wonden t.g.v. de instrumentatie (uittredeplaatsen katheters in baarmoeder en flank) moeten worden hersteld. Daarbij is het risico op complicaties na keizersnede voor de ooi verhoogd, waardoor de herstelperiode na operatie verlengd zijn met langer en hoger ongerief voor het dier. Een ander aspect is de vraag wat met de ooiën zou gebeuren als ze in leven gelaten worden en het herstel van de operatie hebben doorgemaakt. Hergebruik in een ander experiment zou opnieuw lijden tot ongerief. Op dit moment zijn er ook geen lopende onderzoeken in volwassen schapen in onze instelling. Uit eerdere ervaring uit ons onderzoeksgroep heeft de net doorgemaakte zwangerschap ook invloed op een aantal fysiologische parameters. Bij voorbeeld veranderen tijdens de zwangerschap de longen en het cardiovasculair stelsel. Het gebruik van deze dieren in een studie samen met niet zwangere dieren wordt daardoor wel beperkt. Om wel gebruik te maken van de dieren hebben wij in de afgelopen jaren regelmatig lichaamsmateriaal van opgeofferde ooiën aangeboden aan andere laboratoria. Op die manier kunnen zij hun lab technieken testen en verfijnen, waardoor de kwaliteit van onderzoek in schapen in de toekomst verbeterd wordt. Verder wordt met lichaamsmateriaal in vitro werk op bepaalde vraagstellingen gedaan, zonder dat extra proefdieren nodig zijn. Samenvattend, zijn wij daarom van mening dat het bijkomende vermijdbaar ongerief voor het dier zwaarder weegt dan het doel het dier voor een onzekere toekomst in leven te houden.

**34. U geeft aan dat: "... In this case the lamb can be intubated by tracheotomy" Zoals de 5.1 lid2h deze passage leest betekent dit dat u van plan bent geen tracheotomie toe te passen, maar in plaats daarvan een humaan eindpunt. Klopt deze lezing?**

Wij zullen inderdaad geen tracheotomie toepassen op onze lammeren, daar het ongerief niet opweegt ten opzichte van de wetenschappelijke winst. Daarnaast zijn dieren met een tracheotomie niet geschikt voor lange termijn overleving. Intubatie van lammeren vindt altijd plaats onder supervisie van een neonatoloog. De grootste oorzaak waarom een intubatie niet zal lukken is spasme van de stembanden. In geval van spasme, zal de intubatie worden uitgevoerd door de neonatoloog en zullen wij te alle tijden eerst een medicamenteuze behandeling toepassen om het spasme op te heffen. Indien intubatie na deze maatregelen niet lukt zal dit als een humaan eindpunt worden gedefinieerd. Wij hebben dit aspect verder uitgewerkt in appendix 1 punt E.

**35. Vanwege de summiere beschrijving van de procedures die geen betrekking hebben op het pre-term model kan de DEC niet inschatten of er specifieke humane eindpunten zouden moeten zijn voor deze handelingen. Kunt u deze HEP's aanvullen, indien nodig?**

Voor handelingen die met name worden uitgevoerd in de lange termijn studie hebben wij geen humane eindpunten gedefinieerd.

Wél hebben wij een humaan eindpunt gedefinieerd voor de MRI-procedure op 2 maanden. Dit humaan eindpunt omvat het volgende:

Unsuccessful weaning of ventilator support after MRI.

- FiO<sub>2</sub> >0.30 at 12 hours post MRI
- SaO<sub>2</sub> < 80% for more than 1 hour with maximal flow of 15L/min and FiO<sub>2</sub> of 1.0
- Extubation failure within after a second weaning attempt
- Need for O<sub>2</sub> treatment for more than 72 hours post extubation

Het humane eindpunt is opgenomen in appendix 1 sectie E '*humane endpoints for lamb (long-term)*'.

## **F. Classificatie van ongerief**

**36. Hoeveel bloed gaat u maandelijks afnemen? Welke plaats?**

Op de intensive care zullen wij dagelijks bloed afnemen (2ml) via reeds aangebrachte katheters ten behoeve van laboratoriumanalyse en monitoring van het dier (onder anderen bloedbeeld, hemoglobine, hematocriet, glucose). Daarnaast zullen wij bloedgasen afnemen om het ventilatiebeleid bij te kunnen sturen. Dit gebeurt ieder 3 uur (0.2 ml).

In de dieren uit de lange termijnstudie zullen wij zullen bloed afnemen middels venapunctie in de voorpoot. Wij zullen maximaal 6mL/kg per bloed afnemen per maand. In de eerste 4 maanden (schaap weegt >5 kg op maand 1) nemen wij max. 10 mL per keer af, in maanden 5 tot en met 11 nemen wij max. 20 ml bloed af en in maand 12 zullen wij max. 100 mL bloed afnemen via een vasculaire toegang in de achterpoot die ook gebruikt wordt voor sedatie tijdens MRI. De bloedafname vindt plaats vóór de MRI om het effect van de intraveneuze anesthetica die tijdens de MRI gebruikt worden immuun cellen in het bloed zo veel mogelijk te beperken. Na MRI zal het schaap geëthanaseerd worden onder algehele anesthesie.

Deze handelingen met het bijbehorende ongerief zijn verder uitgewerkt in een tabel (op basis van vraag 37) in appendix 1 sectie F.

**37. De 5.1 lid2h mist een opsomming van alle individuele manipulaties, frequentie daarvan en het ongerief. U zegt bijvoorbeeld niets over antenatale echo's in ooiën, EEG-metingen, etc. Het is niet voldoende om een aantal ingrepen te beschrijven en aan te vullen met "... and other experimental procedures" De 5.1 lid2h ziet hier graag een tabel waarin voor de individuele combinaties van handelingen (ooiën, foetussen lang/kort durend, foetussen tracing 12 uur) alle handelingen + frequentie plus ongerief per handeling beschreven worden gevolgd door een afgeweging wat het cumulatief ongerief voor de individuele dieren in een behandelingspad zal zijn.**

In de beneden staande tabel staan de handelingen opgesomd die uitgevoerd worden in de ooiën en lammeren. Alle lammeren (korte termijn, lange termijn en tracing) ondergaan in essentie dezelfde procedures. Indien er een verschil is, is dit in de tabel gespecificeerd.

De 5.1 lid2h vraagt naar het ongerief bij antenatale echo's. Twee antenatale echo's vinden plaats bij het fokbedrijf en worden uitgevoerd door een gespecialiseerd bedrijf. Deze echo's worden uitgevoerd om dracht te bevestigen en de hoeveel lammeren per ooi. Op basis van deze echo's worden de ooiën geselecteerd die geschikt zijn voor het betreffende experiment. Op de centrale proefdiervoorziening wordt bij de pre-anesthesie check ook nog een echo uitgevoerd. Dit wordt gedaan omdat de ooiën voorafgaande aan het experiment in een weide worden gehuisvest. Het kan voorkomen dat een eventuele abortus in de weide wordt gemist omdat er geen dood lam wordt gevonden. Om een gemiste abortus uit te sluiten voeren wij tijdens de pre-anesthesie check nog een echo uit.

Deze tabel is ook toegevoegd aan appendix 1, sectie F.

Procedure	Frequency	Discomfort	
<b>Antenatal/ in utero:</b>			
		<b>Ewe:</b>	<b>Fetus/lamb:</b>
Pre-anesthesia check incl. ultrasound	1x	Mild	None
Instrumentation under general anesthesia	1x max 2 hours	Moderate	Mild
Postoperative antibiotics (intramuscular)	4 days 2dd	Mild	n/a
Intra-amniotic exposure to LPS	1x	Mild	Mild
Corticosteroids injection (intramuscular)	1x	Mild	
C-section (modified EXIT, including intubation and if needed (long term study) placement vascular catheters) under general anesthesia	1x max 30 minutes	Mild	Short-term and tracing: Mild  Long-term: mild-moderate
Spontaneous birth (term born references)	1x	Mild	n/a
Euthanasia (general anesthesia)	n/a	Non-recovery	n/a
<b>LICU:</b>			
Mechanical ventilation (no sedation)	72 hours	n/a	Moderate
Intravenous administration stem cells in pre-existing catheter	1x	n/a	None
Blood drawing in pre-existing catheters for bloodgas (0.2 mL)	> 10x	n/a	None
Blood drawing for laboratory analysis (pre-existing catheter)	1x during C-section (2mL) 2x (daily) via pre-existing catheters (2mL)	n/a	None
Finger feeding	Every 2-4 hours	n/a	Mild
EEG	Continuous 72 hours	n/a	Mild
Ultrafast Doppler ultrasound (in rest/sleep)	Max 3x 15 minutes	n/a	Mild
Euthanasia (only short term and tracing; under sedation)	1x	n/a	Mild
<b>Long-term postnatal:</b>			
Weaning off ventilator support		n/a	Mild/Moderate
MRI (general anesthesia)	1x at 2 months (including recovery)	n/a	Moderate
	1x at 12 months (end of experiment)		Non-recovery
Blood collection	1x during C-section (general anesthesia)	n/a	None
	9x in stable		Mild/moderate
	2x during MRI under general anesthesia		None
EEG	2x during MRI (general anesthesia)	n/a	Mild
Ultrafast doppler	2x during MRI (general anesthesia)	n/a	Mild
Gait analysis incl. training	At 8 and 12 months	n/a	n/a Mild
Maze testing incl. training	At 8 and 12 months	n/a	Mild
Euthanasia (general anesthesia MRI)	1x	n/a	Mild

## **G. Vervanging, vermindering, verfijning**

**38. U zegt: “We keep all lambs as much as possible in groups” Dit suggereert dat hier soms van afgeweken wordt. Maar dit wordt niet beschreven onder huisvesting. Onder welke condities worden dieren individueel gehuisvest en wat zijn de gevolgen voor het ongerief.**

In ons project streven wij ernaar om de lammeren in de lange termijnstudie zoveel mogelijk in groepen te huisvesten. In de volgende omstandigheden zullen wij hiervan afwijken:

- 1) Tijdens bevalling van de à term geboren lammeren, zullen de oaien en lammeren tijdens de bevalling apart gezet worden van de andere oaien in de kudde. Dit is alleen gedurende de bevallingsperiode en zal niet tot additioneel ongerief leiden.
- 2) In verband met infectierisico worden lammeren van verschillende leeftijden gescheiden per leeftijdsgroep. Een leeftijdsgroep bestaat uit maximaal 4 dieren. Het is mogelijk dat 3 van de 4 dieren uitvallen. In dit geval streven wij ernaar deze zo snel mogelijk bij een andere groep lammeren te plaatsen. Dit zal altijd in overleg met de animal welfare officer/ dierarts gebeuren, en tot die tijd zal het overgebleven dier tijdelijk individueel geplaatst worden, doch binnen auditieve, olfactorische en visuele afstand van de andere lammeren.

Huisvesting is verder uitgewerkt in appendix 1 sectie G.

## **K. Bestemming van de dieren bij einde experiment**

**39. De oaien die natuurlijk bevallen van de lammetjes blijven toch bij de lammetjes? Wanneer gaat u de moederdieren ter adoptie aanbieden?**

De oaien zullen ter adoptie worden aangeboden op het moment dat de lammeren volledig gespeend zijn en niet meer afhankelijk zijn van de moeder. Dit moment is meestal tussen de 3 en 4 maanden leeftijd. Het scheiden van oaien en hun lammeren is ook belangrijk omdat lammeren op dit moment geslachtrijp worden en wij sowieso de lammeren op basis moeten scheiden. Het exacte moment wordt in overleg met de dierenarts en de centrale proefdiervoorziening vastgesteld.

## Bijlage II:

### Vragen 5.1 lid2h d.d. 22-03-2022 en Antwoorden VO d.d. 22-03-2022

1. In de beantwoording van de vragen geeft u meer details over de procedures van de gait analysis test en, in mindere mate, de maze test. Belangrijk details die wel in uw antwoord te lezen zijn ontbreken nog steeds in de appendix. Kunt u die nog toevoegen zodat de aanvraag op zichzelf lees- en beoordeelbaar is.

Wij hebben de handelingen omtrent gait toegevoegd aan appendix 1. Voor maze testing hebben wij de volgende details aan appendix 1 toegevoegd:

*"Feasibility of Maze testing will be tested in preterm born sheep from another protocol based on protocol set-up by Hunter, D.S., et al., Physiology & behavior, 2015. 139: p. 244-253 and Murray, S.J., et al., Frontiers in Veterinary Science, 2022. During these trials we will also determine the choice of maze that will be used (i.e. diamond vs. Y-maze). Maze testing will be performed in collaboration with institutional and international collaborators with experience in behavioral testing in rodents and sheep.*

*Briefly, sheep are trained to walk through a maze (example of diamond maze in figure 3) where all gates are open. As such, the sheep can exit the maze out of either arm. The side most frequently used to exit will be used in later tasks as their preferred side. Following training, the sheep will undergo a habituation task in which the sheep is guided down one of the maze arm to a closed gate and trained to turn around at the dead end and exit the maze through the other open arm. After training the memory task will be performed in which the sheep has to go down the maze by itself (preferred side) followed by a reversal task in which the gates are swapped at multiple times. Each sheep get multiple trials of a max of 5 minutes per trial. When a sheep exits the maze it will be rewarded in the 'reward' pen by allowing for close proximity with flock-mates, and access to a food reward during  $\geq 10$  second rest period between runs. If a sheep is not able to exit the maze (trial fail) it is guided out of the maze towards the 'reward' pen for  $\geq 10$  seconds.*

*Measures recorded during the maze tasks included total trials and time taken to complete each trial, numbers of vocalizations in each trial, and number of arm entries and average time per trial in criterion trials. Sheep are also classified according to the method they used to exit the maze (complete the task) within the three minutes available."*

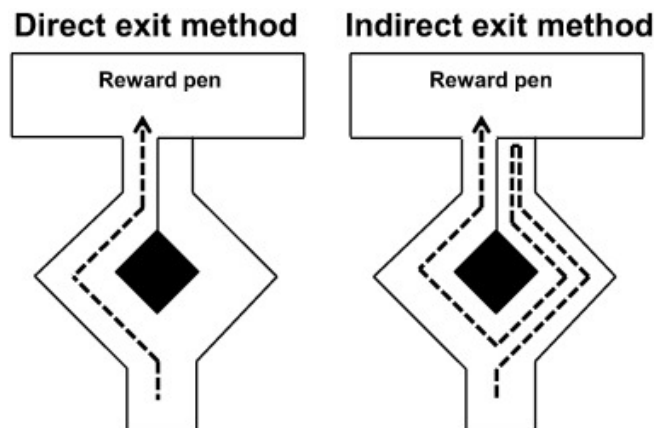


Figure 3: Example of a 'diamond' maze and different methods to exit the maze

2. Voor de maze test is voor de 5.1 lid2h nog niet duidelijk of het opzetten van deze test onderdeel van uw projectvoorstel is of dat deze proeven al onder een ander voorstel vergund zijn. De tekst suggereert dat u de term-born controle groep wilt gebruiken om de test op te zetten en te valideren. Dit lijkt geen logische strategie voor een goede vergelijking tussen alle groepen. Kunt u aangeven of u inderdaad van plan bent pilot en implementatie in het kader van dit projectvoorstel uit te voeren? Zo ja moeten er dan geen (extra) dieren voor een pilot / implementatietraject aangevraagd worden? Kunt u een korte beschrijving van de proeven en de gevolgde strategie voor implementatie en go/no-go geven?



Implementatie van de MAZE test wordt reeds aangevraagd voor een ander projectvoorstel **5.1 lid2h** waarin wij op dit moment een cohort vroeggeboren lammeren hebben staan met een vergelijkbare experimentele opzet. Deze lammeren zullen ook een gait analyse ondergaan (reeds gegund).

Succesvolle implementatie van MAZE in dit cohort dieren zal als GO/no-GO dienen voor implementatie van MAZE in het huidige projectvoorstel waardoor additionele dieren als pilot groep niet nodig zal zijn. Wij hebben dit ook als volgt aangepast in het projectvoorstel onder sectie 3.4.1:

*"With maze testing we will assess cognitive and memory abilities which are also often affected by EoP. We are currently in the process of setting up the maze testing for sheep in preterm born sheep exposed to perinatal inflammatory stress. As such, successful implementation of maze testing in healthy controls is a milestone and will serve as a GO moment to further implement this technique with lambs born in the current project."*

De inhoudelijke beschrijving van de MAZE-proeven staan reeds beschreven als reactie op vraag 1.

## **Bijlage III:**

### **Vraag 5.1 lid2h d.d. 25-03-2022 en Antwoord VO d.d. 25-03-2022**

---

**Het is duidelijk waarom te vroeggeboren lammeren niet kunnen opgroeien bij een surrogaatmoeder. Het is minder duidelijk waarom u ervoor kiest om de a terme lammeren niet ook zonder moeder te laten opgroeien, anders dan dat dit minder ongerief voor de dieren zal betekenen. Deze keuze lijkt een schonere vergelijking op te leveren, wat is daarop uw visie? U stelt dat u ervan overtuigd bent dat er geen sprake van zal zijn van een confounder effect o.b.v. eerder onderzoek. Kunt u deze stelling in de aanvraag onderbouwen met data of literatuurverwijzingen?**

In de geplande studie setup vergelijken wij een 'ernstig zieke' groep (LPS-prematuriteit-ventilatie) met een 'zieke' groep (prematuriteit-ventilatie) en een gezonde controlegroep. In de laatste groep is het belangrijk een goede referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt. Hiertoe zijn spontane bevalling op à terme leeftijd en voeding via de moeder meegenomen als natuurlijke elementen om een zo'n best mogelijke start na te bootsen en daarmee een zo gezond mogelijke controlegroep te creëren. Als gunstige bijkomstigheid is er geen sprake van dieren ongerief van de à terme controlegroep.

De enige confounder kan ontstaan bij een gedragstest gedragstest; de fles gevoede dieren zijn vanaf de eerste dag gewend aan mensen. Wij zijn ons hiervan bewust en zullen dit ondervangen in het trainen van de dieren. Daarnaast zullen de à terme lammeren ongeveer 2 maanden na geboorte worden gescheiden van de moeder en worden opgenomen in de kudde preterme schapen. Hier zal al een deel van het aangeleerde gedrag van de preterme schapen worden overgedragen naar de à terme lammeren. De gedragstesten zullen plaatsvinden 6 maanden plaatsvinden na samenvoegen van de kudde.



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene

### gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity

## 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Preterm birth, stated as birth at a gestational age under 37 weeks, is the most important cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries. Of all children born in the Netherlands, more than 7% are preterm. Advances in perinatal medicine, including improvements in respiratory support, resulted in the fact that even the sickest and smallest babies nowadays often survive. However, surviving preterm infants are at increased risk for life-long neurological disorders, collectively termed Encephalopathy of Prematurity (EoP), for which currently **no therapy** is available.

Over the past decade, many epidemiological and preclinical studies of preterm born infants and EoP have identified two antenatal (prenatal) factors that are almost always linked with the severity of EoP: exposure to infection/inflammation (chorioamnionitis) or hypoxia-ischemia (HI) [1-4]. The current proposal will specifically focus on antenatal infection/inflammation as etiological factor for preterm brain injury.

### **Antenatal infection/inflammation**

Chorioamnionitis (i.e. antenatal infection/inflammation) is defined as inflammation of the fetal membranes (chorion and amnion). When the fetus is directly exposed to intrauterine inflammation/infection via direct skin contact or swallowing and breathing movements in utero, the fetal immune system responds with release of pro-inflammatory cytokines that induce a fetal inflammatory response syndrome (FIRS).

Preterm neonates born with FIRS show a higher prevalence of prematurity-associated complications such as, respiratory distress syndrome, sepsis, bronchopulmonary dysplasia, periventricular leukomalacia (PVL), cerebral palsy (CP) and death [5]. Of these, brain injury (PVL, CP) is the biggest contributor to mortality and morbidity in these preterm infants [6, 7]. In fact, preterm infants exposed to FIRS have a risk of developing CP or PVL, that is 1.5 - 3-fold higher compared with unexposed preterm infants [8].

Although chorioamnionitis is an independent risk factor for preterm brain injury [9], in the vast majority of preterm infants, brain injury is caused by accumulation of **multiple perinatal and postnatal inflammatory triggers** comprising antenatal inflammation (i.e. chorioamnionitis) and postnatal injurious triggers such as mechanical ventilation. Whilst this respiratory assistance is essential for survival, ventilation increases the risk and incidence of brain injury [10]. These perinatal and postnatal inflammatory triggers cause a self-perpetuating cycle of peripheral and cerebral inflammation, primarily mediated by activation of microglia, the resident innate immune cells (i.e. macrophages) of the brain. Under physiological circumstances microglia play a central role in synaptic transmission and myelin maintenance. However, upon activation, microglia switch from a trophic/regenerative state to a pro-inflammatory phenotype mediating death and/or maturation blockade of oligodendrocytes. Loss of oligodendrocytes causes myelination defects and subsequent changes in cortical microstructure and connectivity leading to EoP [1, 11-14].

### **Therapy**

Following birth, all preterm infants receive supportive care, including adequate respiratory support, blood pressure support, normalization of fluid-electrolyte balance, and blood glucose levels, and, if necessary, antibiotic treatment, and treatment of seizures. Preterm brain injury evolves over time in a period of hours to weeks, creating a window of opportunity for treatment. However, therapeutic options to improve the outcomes of preterm neonates suffering from brain injury are lacking [1, 15].

Given the dominant role of inflammation in the induction of preterm brain injury, we consider that immunomodulatory interventions have a high potential to support recovery from brain injury in vulnerable neonates. Within this context, we and others have successfully tested the therapeutic effects of immunomodulatory interventions such as interleukin (IL)-2 [16, 17], IL-1 receptor antagonist [18] and pharmacological nutrition with plant sterols [19] on organ injury following fetal exposure to *in utero* inflammation. Moreover, studies have demonstrated the neuroprotective potential of cytokine antagonism or inhibition in the course of antenatal inflammation and hypoxia-ischemia [20, 21]. Immune modulation can be directly effective or indirectly by improving the efficacy of other therapies.

### **Stem cells**

Cell-based interventions as a therapeutic strategy for injury to the (neonatal) central nervous system have gathered much attention in the past decade [22-30]. Many different types of stem cells, derived from fetal,

placental, and adult tissues are currently under investigation [31-36]. Stromal cells, including mesenchymal stem cells (MSCs), have been a particular focus of research as they are easily obtainable (i.e. from cord blood, Wharton's jelly, bone marrow) and do not have the ethical and safety concerns of embryonic stem cells [27, 30]. Moreover, they lack of expression of MHC class II antigens, allowing their use for allogenic therapy [30]. In addition, the efficacy and safety of human SCs (xenotransplantation) has been demonstrated by our and other groups [12, 13, 37-39]. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) has mainly been attributed to their immune-modulatory and regenerative potential [27, 28, 33, 40]. The effects of MSC on the immune system comprise both modulation of innate and adaptive immune responses from a pro-inflammatory status towards an anti-inflammatory status, thereby reducing tissue injury and creating an environment in favor of tissue repair and regeneration [33, 34, 41].

Besides immune modulation in favor of regeneration, MSCs directly affect the injured central nervous system through secretion of neurotrophic factors that stimulate and maintain neurogenesis of the endogenous neuronal stem cell population and its subsequent differentiation into neuronal and oligodendroglial lineages [28, 33, 40, 42-44].

The neuroprotective potential of systemic stromal cell therapy was shown by our group in a preclinical preterm ovine model of global hypoxia-ischemia-induced injury [45-48]. MSC administration during the latent phase following global HI resulted in functional improvement and prevented hypomyelination of the subcortical white matter at 7 days post HI. These protective effects were attributed to anti-inflammatory effects since neuroinflammation and peripheral immune activation were significantly reduced [45, 46]. Specifically, intravenous MSC treatment reduced the proliferative capacity of splenic T lymphocytes with concomitant reduced cerebral T cell infiltration. In addition, systemic stromal cell therapy ameliorated splenic involution caused by global HI, implicating a key role of the spleen in the protective mechanisms of stem cell therapy.

There is increasing evidence for the effectiveness of stem cell administration via the intranasal route (IN) route, which is a feasible route for pharmacological treatment of neonates. This concept of IN administration is based on passage of stem cells over the cribiform plate along the olfactory nerve allowing for rapid dispersion throughout the brain, where local effects can be exerted [49-54]. In a study by van Velthoven et al. delayed (10 days post HI injury) IN administration of MSC therapy improved neurological outcomes 28 days post HI. These improved outcomes following IN administration were attributed to the regenerative potential of MSCs rather than inhibition of injurious (e.g. inflammatory) processes or prevention of injury since cells were administered when injury was readily established [53]. In fetal sheep, delayed intravenous stem cell administration 5 days after global HI was less effective than acute (early) administration 12 hours after reperfusion [55]. Efficacy of early MSC administration was attributed to systemic and neuro-immunomodulatory effects [55].

Although the pathophysiology leading to brain injury in preterm infants between HI and antenatal infection/inflammation show substantial overlap in terms of a systemic immune response towards the brain, there are discrepancies, mostly in temporal evolution/timing of injury, that inhibit translation of findings in HI models to the situation of antenatal infection/inflammation (chorioamnionitis). The critical role of timing was recently confirmed and explored in an LPS kinetics study by our group. In this study, we found that intra-amniotic exposure to LPS induced systemic within 12 h after LPS exposure, followed by neuroinflammatory response at 48 hours post LPS exposure. Interestingly, white matter injury in following antenatal LPS exposure was not detected until 15 days post-LPS exposure [46], whereas white matter injury following global HI was readily visible at 7 days post HI [11, 12, 38]

Collectively, administration route in relation to timing of administration appears to be crucial for the action of MSCs (immune modulation and regeneration) to establish optimal neuroprotection. As such, repeated dosing by different administration routes throughout different phases disease progression might ultimately lead to the greatest benefit.

In the current project we will test the therapeutic effect of early intravenous (IV), and combined early IV and delayed IN administration in a translational ovine model of perinatal inflammatory stress-induced EoP

## References:

1. Ophelders, D.R.M.G., *et al.*, *Cells*, 2020. **9**(8): p. 1871.
2. Leviton, A., *et al.*, *Early human development*, 2016. **93**: p. 25-32.

3. Volpe, J.J., *Semin Pediatr Neurol*, 2009. **16**(4): p. 167-78.
4. Volpe, J.J.T.L.N., 2009. **8**(1): p. 110-124.
5. Wolfsberger, C.H., *et al.*, *Frontiers in pediatrics*, 2020. **8**: p. 401.
6. Goldenberg, R.L., *et al.*, *The Lancet*, 2008. **371**(9606): p. 75-84.
7. Tronnes, H., *et al.*, *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2014. **56**(8): p. 779-85.
8. Reiss, J.D., *et al.*, *Experimental Neurology*, 2022: p. 113988.
9. Gotsch, F., *et al.*, *Clinical obstetrics and gynecology*, 2007. **50**(3): p. 652-683.
10. Barton, S.K., *et al.*, *Neonatology*, 2016. **110**(2): p. 155-162.
11. Hagberg, H., *et al.*, *Nature Reviews Neurology*, 2015. **11**(4): p. 192-208.
12. Jellema, R.K., *et al.*, *PLoS one*, 2013. **8**(8): p. e73031.
13. Jellema, R.K., *et al.*, *Journal of neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 241.
14. Ophelders, D.R., *et al.*, *Journal of neuroinflammation*, 2016. **13**(1): p. 29.
15. Van Bel, F., *et al.*, *Frontiers in physiology*, 2019. **10**: p. 181.
16. Nikiforou, M., *et al.*, *Inflammatory bowel diseases*, 2015. **21**(9): p. 2026-2038.
17. Willems, M.G., *et al.*, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2015. **310**(1): p. L1-L7.
18. Wolfs, T.G., *et al.*, *Mucosal immunology*, 2013. **6**(3): p. 547-556.
19. van Gorp, C., *et al.*, *Nutrients*, 2019. **11**(5): p. 968.
20. Galinsky, R., *et al.*, *Journal of Neuroinflammation*, 2020. **17**(1): p. 1-16.
21. Disdier, C., *et al.*, *Brain sciences*, 2018. **8**(6): p. 101.
22. Bennet, L., *et al.*, *Annals of neurology*, 2012. **71**(5): p. 589-600.
23. Tomanlio, L., *et al.*, *Annals of neurology*, 2011. **70**(5): p. 698-712.
24. van Velthoven, C.T., *et al.*, *Brain research reviews*, 2009. **61**(1): p. 1-13.
25. Gortner, L., *et al.*, *Klinische Pädiatrie*, 2012. **224**(4): p. 233.
26. Borlongan, C.V., *et al.*, *Pediatric research*, 2011. **70**(1): p. 3-9.
27. Donega, V., *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2013. **33**(5): p. 625-634.
28. van Velthoven, C.T., *et al.*, *Pediatric research*, 2012. **71**(4-2): p. 474-481.
29. Dalous, J., *et al.*, *Stem cells and development*, 2012. **22**(1): p. 169-179.
30. Fleiss, B., *et al.*, *Clinics in perinatology*, 2014. **41**(1): p. 133-148.
31. Jiang, Y., *et al.*, *Nature*, 2002. **418**(6893): p. 41-49.
32. Méndez-Ferrer, S., *et al.*, *nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
33. Uccelli, A., *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(9): p. 726-736.
34. Le Blanc, K., *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2012. **12**(5): p. 383-396.
35. Bieback, K., *et al.*, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008. **35**(4): p. 286-294.
36. Portmann-Lanz, C.B., *et al.*, *American journal of obstetrics and gynecology*, 2006. **194**(3): p. 664-673.
37. McDonald, C.A., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(10): p. 2449.
38. Tanaka, E., *et al.*, *Frontiers in neurology*, 2018. **9**: p. 133.
39. Gussenhoven, R., *et al.*, *Stem cells translational medicine*, 2020.
40. Uccelli, A., *et al.*, *Best practice & research Clinical haematology*, 2011. **24**(1): p. 59-64.
41. Siegel, G., *et al.*, *Transplantation*, 2009. **87**(9S): p. S45-S49.
42. van Velthoven, C.T., *et al.*, *The Journal of Neuroscience*, 2010. **30**(28): p. 9603-9611.
43. Rivera, F.J., *et al.*, *Stem Cells*, 2006. **24**(10): p. 2209-2219.
44. Steffenhagen, C., *et al.*, *Stem cells and development*, 2011. **21**(11): p. 1838-1851.
45. Jellema, R.K., *et al.*, *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e73031.
46. Jellema, R.K., *et al.*, *Journal of neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 1-14.
47. Gussenhoven, R., *et al.*, *Stem cells translational medicine*, 2021. **10**(1): p. 57-67.
48. Ophelders, D.R., *et al.*, 2016. **5**(6): p. 754-763.
49. Donega, V., *et al.*, *Experimental neurology*, 2014. **261**: p. 53-64.
50. Donega, V., *et al.*, *PLoS one*, 2013. **8**(1): p. 1-14.
51. Wagenaar, N., *et al.*, *Dev Med Child Neurol*, 2017. **59**(10): p. 997-1003.
52. van den Heuvel, L.G., *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2019. **39**(2): p. 223-239.
53. Van Velthoven, C.T., *et al.*, *Pediatric research*, 2010. **68**(5): p. 419-422.
54. Oppliger, B., *et al.*, *Stem cells and development*, 2016. **25**(16): p. 1234-1242.
55. Li, J., *et al.*, *Experimental neurology*, 2016. **283**: p. 179-187.
56. Blencowe, H., *et al.*, *Reprod Health*, 2013. **10 Suppl 1**: p. S2.
57. Cannavò, L., *et al.*, *Italian Journal of Pediatrics*, 2020. **46**(1): p. 1-5.
58. Boswinkel, V., *et al.*, *European Journal of Radiology*, 2021. **136**: p. 109500.
59. Vaes, J.E., *et al.*, *Glia*, 2021. **69**(3): p. 655-680.

## 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

The main goal of this project is to validate the neuroprotective potential of two SC-treatment paradigms, being early intravenous (IV) and delayed intranasal (IN) *in vivo* a preclinical ovine model of EoP caused by perinatal inflammatory stress, comprising antenatal infection/inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation.

For this purpose, we have the following research objectives:

The specific objectives are:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess the long-term neuroprotective potential of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

The proposed objectives are achievable as we use well-established models that are currently still in use. The laboratory of Pediatrics of 5.1 lid2h has a lot of experience with ventilated preterm lambs has set up a unique infrastructure in which we successfully perform long-term survival studies in preterm lambs.

Moreover, the laboratory of Pediatrics has extensive experience with stem cell applications in ovine models [12, 13, 47, 48]. Moreover, the infrastructure and protocols necessary for such stem cell trials are readily available.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet- en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

### 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Worldwide, 15 million babies are born preterm every year, of which 400.000 are born in the EU and 12.000 in the Netherlands [56]. In 2010, the Global Burden of Disease Study estimated that preterm birth was the commonest cause of death and disability in children under the age of 5 years. We are fortunate that most of these infants survive, but morbidity is very high, predominantly due to neurological damage. Compared to infants born at term, preterm babies have an increased risk of acute and chronic brain injuries such as cognitive deficits and behavioral (40–50%) and cerebral palsy (5–10%) [57]. Currently, treatments to repair the brain damage of EoP are limited [1, 15].

The severity of this neurological injury is highlighted by the fact that in a high healthcare setting more than 50% of babies born before 28 weeks ('extreme preterm') and about 30% of babies born between 28 and 32 weeks ('very preterm') will suffer lifelong disability, including cerebral palsy (CP), severely impaired cognitive functions, and psychiatric disorders such as attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorders (ASD). Even those babies born between 32 and 37 weeks (i.e., 'moderate to late preterm') which accounts for 80% of all preterm births are at increased risk of neonatal mortality and morbidity, including increased rates of CP and lower cognitive performance on standardized IQ exams [58]. As such, prematurity is a significant problem for the provision of long-term educational and health care.

This project aims to validate SCs as a regenerative therapy for EoP to improve the quality of life for these infants and reduce the societal costs of their special needs.

In addition, assessment of bio-distribution in relation to efficacy and cell fate will provide novel and essential mechanistic insight, which will contribute to improve existing treatment paradigms, identify novel therapeutic targets and provide essential data on safety of cell-administration.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

This project has several stakeholders:

- In this project we will use animals to investigate the proposed research questions. The animals will undergo procedures that will cause discomfort. As such, this makes them an important stakeholder in this project. With the available expertise of our research group and novel insight that are gained during this project, we will limit the degree of discomfort. Reduction of discomfort is in the best interest of the animal and will also lead to reliable data.
- Future infants with EoP and their families, caregivers will benefit from this project. EoP is still an unmet clinical need. The results from this project will form the scientific basis for follow-up studies and (ultimately) well-designed clinical trials in which infants will be enrolled. This project now focuses on neonates born moderate/late preterm, but results have the potential to be extrapolated to infants born at earlier stages of pregnancy.
- Other researchers, such as developmental neuroscientists, stem cell biologists, molecular biologists, immunologists, bioinformaticians, and engineering scientists are involved in data acquisition and interpretation.  
They will present data in peer-reviewed papers, theses, and conferences.
- Specialists from the following clinical departments are involved in this study through active input, optimization and execution of specific assessments and data processing: Pediatrics/neonatology, child neurology, pediatric radiology and clinical physics, movement sciences, orthopedics, pediatric nephrology, clinical immunology.  
Active participation of clinical partners is essential for clinical translation of our findings.
- Pharmaceutical partner. The SCs will be provided by a pharmaceutical partner. They are not involved in the actual animal experiments and are not involved in data interpretation or publication of results. However, they benefit from our results and insights as these will aid in further development of the cell product, not only for the clinical indication of EoP, but also others.

### **3.4 Strategie**

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

This project is part of a H2020 consortium that aims to validate umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells (H-MSCs) as a regenerative therapy for preterm brain injury, which will form the basis of well-designed clinical trials.

#### ***Preparatory studies:***

Based on input generated in small animal models by consortium partners on the regenerative abilities of various doses with respect to timing and route of administration of SCs, we will test the most 'promising' dose in our preclinical ovine model of preterm brain injury. Establishment of the most promising dose will be a milestone and will serve as a GO-moment to start with the ovine studies. In previous studies, we already showed that SCs of various sources have therapeutic efficacy without adverse reactions, thereby demonstrating compatibility of SCs in our model(s).

The sheep model closely resembles the human developmental biology in terms of similar fetal and neonatal development of the brain, other organs and the immune system. Moreover, the size of the animal allows fetal instrumentation, inducing antenatal inflammation and neonatal care according to clinical standards. In line with these strong assets, the sheep model has an impressive track record of clinical translation of important therapeutic interventions in neonatal medicine (e.g., therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, maternal corticosteroids for fetal lung maturation and surfactant replacement therapy for respiratory distress syndrome) and basic understanding of fetal and neonatal



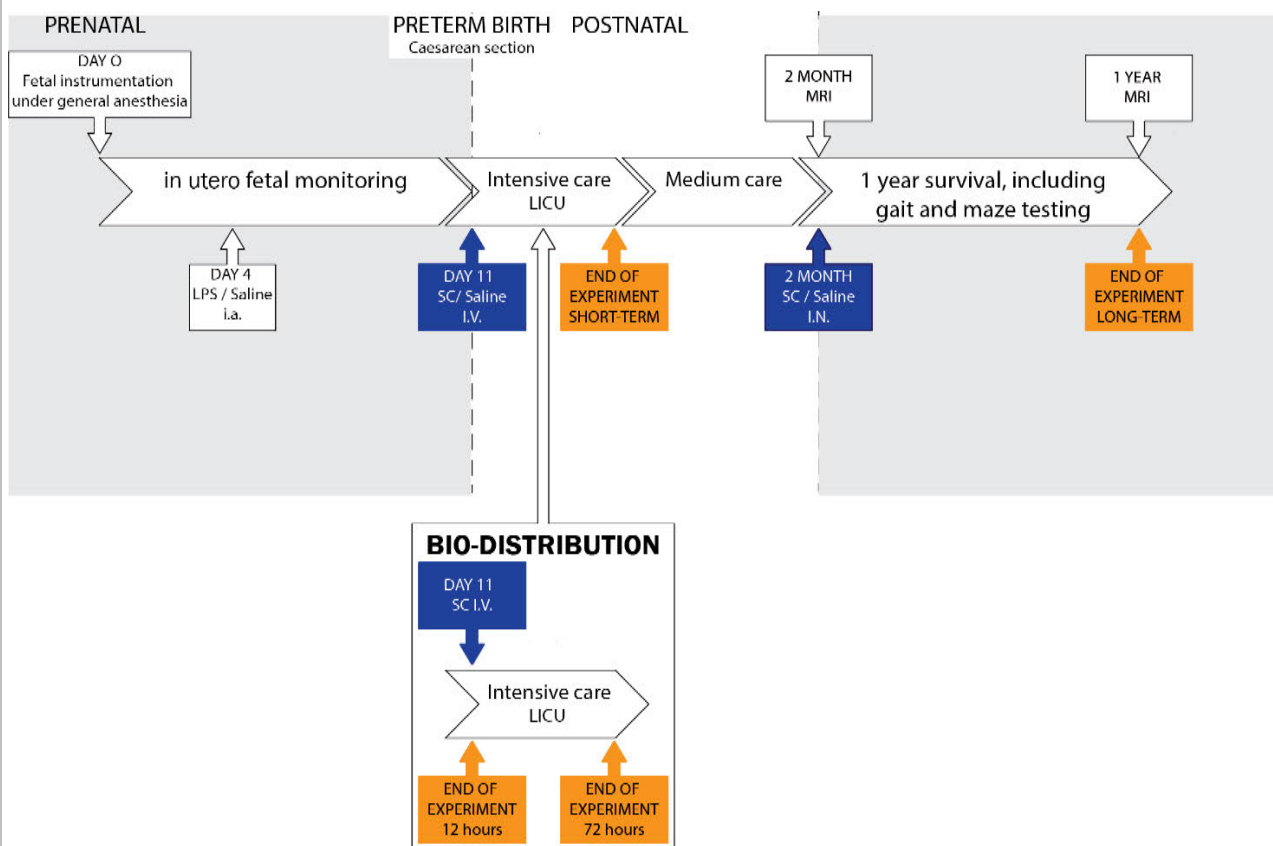
physiology. Therefore, this is one of the most suitable animal models to validate new therapeutic strategies in neonatal medicine.

**Ovine studies:**

For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. We will use this model since brain injury in the vast majority of neonates is caused by accumulation of multiple perinatal and postnatal inflammatory triggers.

For assessment of short-term efficacy, lambs will be euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment (figure 1).

Depending on the experimental group, lambs will receive postnatal SCs via the intranasal route.



**Figure 1 Experimental design.** For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. Stem cells will be administered at 4 hours after preterm birth (intravenous (IV)) and/or intranasal (IN) at 2 months. For assessment of short-term efficacy, lambs are humanely euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment. For bio-distribution will be studies at 12 hours and 72 hours after IV administration.

We will investigate short- and long-term therapeutic efficacy of treatment paradigms based on input generated from a matrix performed in rodents performed by PREMSTEM-consortium partners. In addition, we will investigate short-and long-term bio-distribution and cell fate of the pre-defined treatment paradigms.

A major milestone we already accomplished for this project is that the models we use (both long- and short-term) are successfully up and running. Moreover, from the rodent studies performed by our consortium partners, it became evident that that delayed intranasal SC administration at 2 months postnatal in particular neuro-protective effect. In addition, the preliminary work done by our laboratory and that of colleagues has shown that intravenous administration of SCs within 24-48 hours after preterm birth has a protective effect on the brain and other organ systems, including the lung. Based on these data, will only test the short-term effects of an "early" intravenous and the long-term effects of a combined "early" intravenous and "delayed" intranasal SC administration.

We will explore the protective potential of SCs on the structural and functional outcome of the preterm brain in our ovine model. Since development of EoP finds its origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation), that cause a self-perpetuating cycle of systemic and cerebral inflammation, we will administer SCs intravenous (IV) immediately after preterm birth. With the IV dose, we want to investigate (in the circulation) the effects of perinatal stress on neurodevelopmental and immunological outcome during the transition from fetus into childhood till adulthood.

Perinatal stress is associated with direct neurodevelopmental injuries (such as seizures), with potential life-long consequences, such as cognitive and movement impairments. Consequently, such latter consequences can only be proven at in later life (1 year in sheep). Therefore, the therapeutic effects will be studied during early postnatal life (**objective 1**) and at adulthood in comparison to term born reference lambs to correct for possible long-term effects of preterm birth alone (**objective 2**). Moreover, short-term assessment will provide essential mechanistic insights in to further clarify the working mechanism of the IV administered stem cells.

Although early targeting of inflammatory processes leading to EoP with IV administration might be an effective strategy, it remains to be clarified that this therapeutic effect is permanent or that a proportion of neonates might still develop a form of structural brain injury with life-long functional consequences. In these infants, a second dose of IN stem cells, at 2 months when structural injury is clinically evident, will potentially boost endogenous regeneration and prevent or diminish further functional disability in later life. However, the neuroprotective effects of IN stem cell therapy can only be assess in a long-term cohort.

In this project we will start with **objectives 1 and 3**, being short-term neuroprotective potential of IV administered SCs and cell tracing, followed by longitudinally assessment of the long-term neuroprotective potential SC delivery (**objective 2**).

We will longitudinally assess our read-outs at 8 and 12 months. After assessment at 12 months, the end of experiment in the long-term study is reached. We have chosen to assess functional neurodevelopment (gait and maze) at 8 months as training of the animals for these purposes requires a substantial amount of time and it is not yet well-defined when training is completed. Gait analysis is measured in our lambs since children born with EoP show aberrant motor function including aberrant walking patterns.

We have previously successfully performed gait analysis on lambs from 8 months onwards, which is a **milestone** for the proposed experiments. We will start training for gait analysis and maze testing at an early age. If successful training, defined as the ability to calmly walk on a leash and to calmly walk on a treadmill, is accomplished earlier than at the proposed 8 months, we will perform this assessment at a younger age. Successful training will, therefore, serve as a **GO** moment for gait analysis.

With maze testing we will assess cognitive and memory abilities which are also often affected by EoP. We are currently in the process of setting up the maze testing for sheep in preterm born sheep exposed to perinatal inflammatory stress. As such, successful implementation of maze testing in healthy controls is a **milestone** and will serve as a **GO** moment to further implement this technique with lambs born in the current project.

Cell tracing (**objective 3**) will be studied at 12 hours and at 72 hours. We will assess bio-distribution at 12 hours since the administered cells are still viable at this time point and we can assess the location where

these cells have migrated to and will exert their function. Assessment of bio-distribution at 72 hours post administration will provide mechanistic insight in the stem cell fate and on the interaction between the stem cells and their micro-environment (e.g. other cells).

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

##### **Short- and long-term survival:**

Development of EoP seems to originate in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of SCs in the context of these factors. Importantly, neurodevelopmental complications can emerge at different stages throughout life, including during adolescence or young-adulthood. Consequently, we aim to investigate the effects of SC therapy in early life and at adulthood. We will start with the short-term and cell tracing experiments followed by long-term survival studies. Short-term and tracing studies will be done simultaneously as some of the animals are labeled for both studies and all experimental procedures are identical.

In the proposed study, we will investigate both short- and long term effects of SC treatment through assessment and correlation of functional, histological and cellular parameters. These data will provide essential mechanistic insights into the development of brain pathologies after preterm birth/perinatal inflammatory stress and the effects of the therapy and are, in part, performed with tissues and cells acquired postmortem. Within this context, long-term studies are not dependent on the results of the short-term studies since effects of perinatal inflammatory stress with and without SC treatment often become visible at later stages in life, whereas cellular/molecular changes that serve as the basis for these effects might be (transiently) present at an early stage.

##### **Cell tracing:**

Cell tracing (**objective 3**) will be studied at 12 hours and at 72 hours following IV administration. We will assess bio-distribution at 12 hours since the administered cells are still viable at this time point and we can assess the location where these cells have migrated to and will exert their function. Assessment of bio-distribution at 72 hours post administration will provide mechanistic insight in the stem cell fate and on the interaction between the stem cells and their micro-environment (e.g. other cells).

Cell tracing will only be performed on the IV administered SCs since IN administration is performed at 2 months post preterm birth and molecular outcomes are assessed at 1 year. Due to the size of the animal (>40kg at 1 year), the discriminative power of our laboratory technique is too little to reliably detect cells. In addition, in a study by Vaes et al., conducted in a rodent model of EoP, stem cells labeled with multimodal nanoprobe actively migrated to injured brain regions after intranasal administration to exert their function. Migration of stem cells was driven by release of chemo-attractants by injured brain tissue [59].

#### 3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Perinatal inflammation with postnatal survival
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- |                                                         | Volgnummva | Titel dierproef                                |
|---------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------|
| 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in. | 1          | Perinatal inflammation with postnatal survival |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

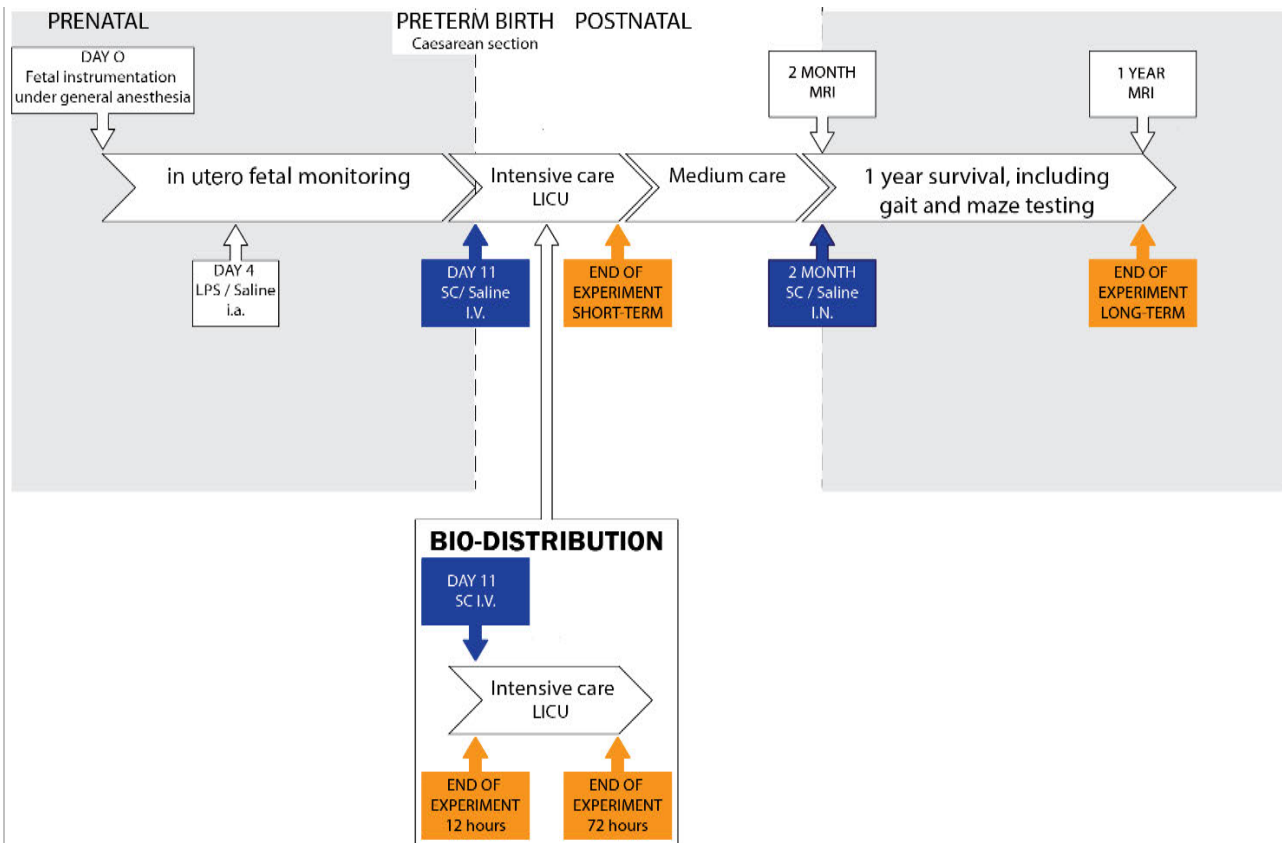
The main goal of this project is to validate the neuroprotective potential of two SC-treatment paradigms, being early intravenous (IV) at and delayed intranasal (IN) *in vivo* in a preclinical ovine model of EoP caused by perinatal inflammatory stress, comprising antenatal infection/inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation.

For this purpose, we have the following research objectives:

The specific objectives are:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess the long-term neuroprotective potential of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation).
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

We will investigate these objectives in a translational ovine model of perinatal inflammatory stress, comprising antenatal inflammation, and postnatal mechanical ventilation (figure 1).



**Figure 1 Experimental design.** For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. Stem cells will be administered at 4 hours after preterm birth (intravenous (IV)) and/or intranasal (IN) at 2 months. For assessment of short-term efficacy, lambs are humanely euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment. For bio-distribution will be studies at 12 hours and 72 hours after IV administration.

For assessment of short-term efficacy, lambs will be euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilation support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment.

For cell tracing experiments lambs will be euthanized 12 hours and 72 hours after SCs administration.

**Neurodevelopmental outcomes:**

Short-term:

Functional/behavioral: amplitude-integrated (a)EEG, MRI, Sleep-wake cycles, ultrafast Doppler ultrasound

Structural: histology (white matter injury and neuroinflammation), MRI, ultrasound

Molecular: microglia, astrocytes, CSF

Long-term:

Functional/behavioral: aEEG, MRI, Sleep-wake cycles, ultrafast Doppler ultrasound, gait analysis, maze testing

Structural: histology (white matter injury and neuroinflammation), MRI, ultrasound

Molecular: microglia, astrocytes, CSF

Our **primary neurodevelopmental outcome** parameters are neuroinflammation and white matter injury. Besides assessment of neurodevelopment, we will also assess pulmonary development/function, renal development/function, cardiovascular development/function, intestinal development/function.

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

### **Fetal instrumentation and antenatal inflammation**

For this project, pregnant ewes with singleton fetuses (119-121 dGA, term is ~147 days) will undergo fetal instrumentation under general anesthesia. Previous experiments in the Pediatrics lab have proven feasibility and reliability of this operation method with minimal fetal or maternal losses [1]. During instrumentation fetuses are exposed via a maternal laparotomy and hysterotomy. After exposure, the fetuses are equipped with arterial and venous catheters and a catheter in the amniotic cavity. Following placement of the catheters, the uterus and maternal abdomen are closed and all catheters are exteriorized via a trocar hole in the maternal flank. These catheters enable fetal monitoring (blood gas), blood sampling to assess their inflammatory status and the amniotic line allows for administration of lipopolysaccharide (LPS).

For the long-term studies, no vascular catheters will be placed as these impair postnatal survival since they need to be surgically removed and there is a risk of hind leg ischemia/hypoperfusion due to obstruction of arterial perfusion.

After a recovery period, fetuses will be exposed to antenatal inflammation induced by intra-amniotic (antenatal) LPS exposure at 125 dGA.

### **Postnatal survival and neonatal care**

Seven days after induction of antenatal inflammation, the lambs are born preterm via Caesarean section, intubated, and transferred to the Lamb Intensive Care Unit (LICU) where they receive intensive neonatal care including mechanical ventilation. Immediately after preterm birth, the ewe is euthanized while under general anesthesia. The maturational age was chosen due to relative lung and brain immaturity, sensitivity to perinatal inflammatory stress including antenatal LPS exposure and ventilator injury.

In case of the long-term animals, vascular catheters will be placed during Caesarean section in the umbilical vessels or hind leg (modified EXIT-procedure). Surfactant replacement therapy will be started immediately to maintain proper gas exchange and continued until the fetus/lamb does not depend on exogenous surfactant to maintain sufficient gas exchange. Parenteral feeding will start immediately after birth according to clinical guidelines and will be supplemented with enteral feeding of colostrum within 6 hours after birth. Vital parameters, incl. blood pressure, oxygen saturation, temperature, ECG and EEG are monitored continuously with subdermal needle electrodes that are also used in preterm infants in the clinic. These needle electrodes are placed shortly after Caesarean section, before the lamb is awake and will remain in situ for continuous measurements during the 72 hour ventilation period. The electrodes are connected by cables to a measuring system. The freedom of movement of the lambs in the hammock is not impeded by the cables.

Ventilation parameters (FiO<sub>2</sub> and frequency) are continuously adjusted based on arterial blood gas analysis and pulse oximetry. After 72 hours, the short-term animals are euthanized and organs and tissues will be collected for laboratory analyses. At 4-6 hours postnatal lambs will receive an IV bolus of SCs or an equal volume of sterile saline. This IV dose is aimed at modulation of the peripheral inflammatory/immune response, which is at the center of the pathophysiology of perinatal inflammatory stress-induced EoP [2].

### **Long term survival**

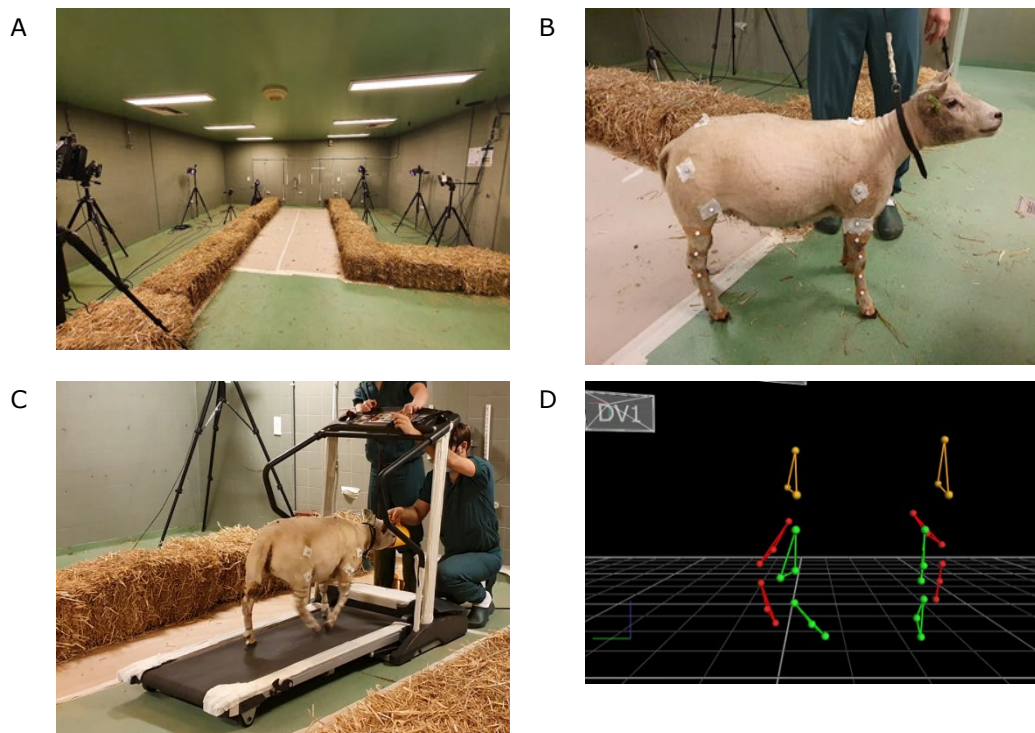
For the long-term follow-up, animals will be weaned of ventilator support according to established protocols. As soon as the lambs are independent of respiratory support, we will start our protocol for motherless rearing for as long as needed. In house care is provided until the lambs are able to be kept in the meadow. Blood samples will be taken during survival (max 1 blood draw per month, max 6 ml/kg bodyweight).

At two months animals will receive a 'delayed' intranasal (IN) dose of SCs or an equal volume of sterile saline (also IN). With this (delayed) IN dose the SCs will migrate into the damaged brain and act as a biologically responsive source of growth factors [3, 4].

Neurodevelopment will be monitored longitudinally at 2 months after preterm birth and at the end of the experiment (1 year) with MRI and EEG. EEG signals will be collected during the period when the sheep are under anesthesia for MRI scans, which will limit discomfort.

In addition, functional neurodevelopment will be assessed at 8 and 12 months with gait analysis (walking pattern) and maze testing (memory/cognition).

Gait analysis is performed in collaboration with colleagues from the department of exercise sciences and takes place in a stable at the central animal facility equipped with a special camera setup aimed at a catwalk over which the sheep walk up and down under the guidance of a researcher/caretaker (Fig. 2A). For this procedure, the sheep are leashed, which requires training in advance. As they walk along the catwalk, cameras will record reflectors placed at strategic locations (joints) on the sheep (Fig. 2B). The sheep will also walk on a treadmill at alternating speeds (Fig. 2C). Alternating speed often makes abnormal walking patterns even more evident. Walking on a treadmill also requires training. Figure 2D shows a processed image of the reflectors on the sheep. Gait analysis makes it possible to express movement patterns and disorders in number and size.



**Figure 2: Overview of gait analysis performed on sheep.** A. Sheep will be guided over a catwalk that is equipped with a camera setup; B. Sheep will be fitted with reflectors that are picked up by the camera system; C. Sheep will walk on a treadmill at alternating speeds; D. Example of a camera image.

Feasibility of maze testing will be tested in preterm born sheep from another protocol based on protocol set-up by Hunter, D.S., *et al.*, *Physiology & behavior*, 2015. **139**: p. 244-253. [5] and Murray, S.J., *et al.*, *Frontiers in Veterinary Science*, 2022. **9**. [6]. During these trials we will also determine the choice of maze that will be used (i.e. diamond vs. Y-maze). Maze testing will be performed in collaboration with institutional and international collaborators with experience in behavioral testing in rodents and sheep.

Briefly, sheep are trained to walk through a maze (example of diamond maze in figure 3) where all gates are open. As such, the sheep can exit the maze out of either arm. The side most frequently used to exit will be used in later tasks as their preferred side. Following training, the sheep will undergo a habituation task in which the sheep is guided down one of the maze arm to a closed gate and trained to turn around at the dead end and exit the maze through the other open arm. After training the memory task will be performed in which the sheep has to go down the maze by itself (preferred side) followed by a reversal task in which the gates are swapped at multiple times. Each sheep get multiple trials of a max of 5 minutes per trial. When a sheep exits the maze it will be rewarded in the 'reward' pen by allowing for close proximity with flock-mates, and access to a food reward during  $\geq 10$  second rest period between runs. If a sheep is not able to exit the maze (trial fail) it is guided out of the maze towards the 'reward' pen for  $\geq 10$  seconds.

Measures recorded during the maze tasks included total trials and time taken to complete each trial, numbers of vocalizations in each trial, and number of arm entries and average time per trial in criterion trials. Sheep are also classified according to the method they used to exit the maze (complete the task) within the three minutes available.





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

**Group sizes and statistics:**

Group sizes were calculated with G\*power. Based on previous (unpublished) sheep work, we detected an effect size of  $F=0.51$  for the number of cells/mm<sup>2</sup> that stained for microglial markers IBA-1 (measure for neuroinflammation) in the periventricular white matter between controls, LPS exposed and SC treated animals in an ovine model of perinatal inflammatory stress, comprising antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation (72 hours) Based on these data and assuming an ANOVA setting, with a power of 80%, and  $\alpha=0.05$  (two-sided) for 4 experimental groups we anticipate requiring **12** fetuses/group x 4 groups. Based on dropout rates for the short-term animals of 20%, we request **15** pregnant sheep and fetuses per group and **60** in total.

In the long-term experiments we have a 30% drop-out rate in non-exposed (sham, no LPS exposure) groups and a dropout rate of 35% for LPS exposed animals and 5% for term born references. Drop-out rates are based on previous experiment in this model. In the LPS-exposed groups are higher compared to non-exposed groups as these animals are more prone to (lethal) infections and require prolonged respiratory support (unpublished findings).

As such, we anticipate requiring **16** pregnant sheep and **16** fetuses per group in the non-exposed animals, **12** pregnant ewes and **12** lambs for the term born reference groups and **17** pregnant sheep and **17** fetuses in the LPS-exposed groups. In total, we require **78** ewes and **78** lambs for long-term experiments.

We estimate, based on the work by Vaes at al.,[7] which showed significant higher migration of labeled stem cells towards the brain 12 hours after administration in injured animals with n=6 animals, we estimate to require a similar number of animals. Similar to the short-term animals these lambs will undergo fetal instrumentation. However, the risk for dropout is lower in the animals that are planned to for 12 hours (10%) ventilation when compared to 72 hours ventilation (20%). As such, for 12 hour cell-tracing we estimate to need **7** ewes and **7** lambs per experimental group. In total we require **14** ewes and **14** fetuses. Similar to the short-term animals these lambs will undergo fetal instrumentation. However, the risk for dropout is lower in the animals that are planned to for 12 hours (10%) ventilation when compared to 72 hours ventilation (20%).

We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 30 animals.

Collectively, we will need a total of **152 pregnant ewes and 152 fetuses/lambs (total 304 sheep)**.

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Sheep	Breeder	Pregnant ewe	152	Female	n/a	n/a
2	Sheep	Breeder	>2/3 gestation	152	Male and Female	n/a	n/a

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	We have chosen Texel sheep for these experiments since ovine fetal development, in terms of white matter myelination, lung alveolarization and intestinal crypt formation, is comparable to human fetal development: both processes start prenatally and continue postnatally, whereas these processes start postnatally in rodents [8]. Moreover, the size of the ovine fetus/lamb allows for chronic <i>in utero</i> instrumentation and allows the use of ventilation equipment and ventilation strategies currently used in clinical practice. Furthermore, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes for most organs.
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	Important, therapies that are now the golden standard in human neonatal care, such as antenatal steroids, surfactant replacement therapy and neonatal cooling were developed in preterm lambs.
Herkomst	Our sheep are purchased from a Texel sheep breeder, contracted by 5.1 lid2h that is able to perform time-mated breeding.
Levensstadia	Pregnant ewes with singleton fetuses (>2/3 of gestation). Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate <i>in utero</i> growth before transport to the animal facility.
Aantal	152 ewes and 152 fetuses
Geslacht	We will use pregnant ewes (female) and fetuses/lambs of both genders
Genetisch gewijzigd	n/a
Stam	n/a

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

During birth and shortly after birth (72 hours) of term reference controls, the ewes are housed individually. Individual housing, and later with the newborn lamb will reduce stress during labor, promote bonding between the mother and the lamb and enables researchers and caretakers to closely monitor feeding behavior of the newborn lamb.

Due to infection risks, we keep lambs from different experimental batches separate until they are vaccinated for the first time. We strive to have 3-4 lambs per batch, but in case the majority of animals from a single batch dies, the remaining animal needs to be placed in a new group. However, this will always be in consultation with the animal welfare officer/veterinarian who will assess the risks on placement in a new group. Until this assessment has been done, or in case the health risks are too big, the lamb will remain in individual housing, but within olfactory, auditory and visual distance of the other lambs.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

#### Ewe:

All surgical procedures will be performed under general anesthesia with analgesia (both systemically and locally) Analgesia will be continued after surgery for a minimum of 4 days. Welfare, including pain is assessed at least daily and additional analgesia is administered if needed and after consultation with a veterinarian.

#### Fetus/lamb:

*In utero:*

Whilst on placental circulation (during fetal instrumentation and first part of Caesarean section), the fetus/lamb is sedated through anesthesia of the ewe that crosses the placental barrier.

Postnatal:

Postnatally, the (non-sedated/non-anesthetized) lambs receive analgesia (intravenous) to reduce potential discomfort that arises from the endotracheal tube. After extubation, analgesia is discontinued. Moreover, vital parameters are continuously (24 hours/day) monitored on the lamb intensive care unit by skilled personnel trained to recognize discomfort or complications potentially leading to discomfort and act upon recognition to prevent (further) discomfort).

---

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

**For the ewes the following complications that influence well-being might arise:**

- Intra-uterine fetal death leading to abortion
- Abdominal hernia
- Post-operative infections
- Post-operative gastro-intestinal complications (reduced rumination or ileus) leading to a negative energy balance

**For all fetus/lambs (both short-term and long-term), the following complications might arise that influence well-being:**

- Pain
- Hemodynamic instability
- Respiratory complications (pneumothorax, hypoxia, acidosis)
- Hypoglycemia
- Malnourishment
- Infection (systemic and local)
- Gastro-intestinal complications (diarrhea, infection)

**For lambs that are planned for long-term survival, the following complications might arise in addition to the aforementioned complications:**

- Urinary calculi
- Arthritis
- Shortness of breath

---

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ewe:

- Abortion might occur due to fetal death caused by fetal instrumentation and/or intrauterine infection. However, this is uncommon in this species, and therefore, a major reason to use this species;
- All ewes undergo laparotomy that needs to be closed with sutures. In case pressure on the wound increases due to rumination (coughing up food) there is a risk that the tissue around the suture entrance point of the suture itself tears. This will result in a permanent 'hole' (hernia) in the abdominal wall through which the intestines might herniate leading to severe intestinal ischemia, pain and death.
- Although the ewes are operated on aseptically, they have a permanent wound in their flank through which the catheters are exteriorized. This wound might serve as an entrance point for infectious organisms that persists until the Caesarean section and is a possible risk for infection.
- Due to abdominal surgery or postoperative pain, motility of the maternal intestines might temporarily be reduced or completely absent. This might lead to an intestinal obstruction, reduced food intake and absorption leading to a negative energy balance for the pregnant ewe with potential lethal consequences, also for the fetus.

Fetus/lamb:

- Pain might occur due to increased oxygen need during mechanical ventilation, or due to invasive procedures.
  - Respiratory complications (pneumothorax, hypoxia, and acidosis) might occur to immaturity of the respiratory system.
-

- Hemodynamic instability might occur due to an underdeveloped cardiovascular and respiratory system.'
- Preterm lambs are naturally sensitive for infection due to an underdeveloped immune system. These lambs are equipped with arterial and venous catheters that are potential entrance points for infectious microorganisms into the circulation.
- Entrance points of vascular catheters (porte d'entree) in the lambs might become infected by environmental microorganisms.
- Hypoglycemia might occur due to increased glucose need during ventilation.
- Malnourishment might occur due to motherless rearing and reduced oral intake.
- Gastro-intestinal complications might occur due to prematurity and malnourishment.
- Urinary calculi might form due to (1) underdeveloped renal calcium excretion system due to prematurity often in combination with a urinary tract infection and a mineral dysbalance. These calculi can permanently obstruct the urethra, preventing the lamb to urinate and leading to an overfilled bladder and pain. This complication especially arises in male lambs as they have a sigmoid flexure in the urethra.
- Arthritis in sheep is caused by a bacterial infection of the joints. It usually occurs in young sheep when bacteria localize in the joints after entering the body through the umbilical cord.
- Shortness of breath is predominantly caused by inadequate removal of mucus since the lambs might not be able to cough up mucus. This, in combination with a high work of breathing (retractions and high breathing frequency) that all preterm lambs have in the first weeks, might cause the lambs to become hypoxic.

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

**Ewe:**

- Abortion by itself cannot be prevented. However, recognition of intra-uterine fetal demise and/or pending preterm labor will prevent additional discomfort. Depending on the experimental set-up (need for fetal instrumentation) *in utero* fetal well-being will be checked by daily blood gas analysis. Our staff is trained to recognize symptoms of pending labor. Fetal demise and/or pending preterm labor are described as humane endpoints.
- Abdominal hernia is prevented by the use of a double loop suture that is especially suitable in cases where extended wound support and strength are required.
- Infection will be prevented by aseptic procedures during surgery combined with the use of antibiotics and proper wound care (i.e. antimicrobial spray on wounds).
- Reduced motility is prevented by proper analgesia in combination. In addition, the ewes are not individually housed anymore as this prevented them from walking around. Walking is a strong stimulator of intestinal motility.

**Fetus/lamb:**

- During surgery, the fetus/lamb is anesthetized through the ewe and will receive analgesia via the ewe (medication crossed the placenta). During mechanical ventilation, pain will be targeted via intravenous administration of analgesia.
- Proper ventilation strategies and assessment of vital parameters (blood gas, blood pressure) will prevent adverse physiological reactions (acidosis). Surfactant replacement therapy (standard care) in combination with mechanical ventilation will prevent hypoxia. Pneumothorax will be defined as a humane endpoint.
- Hemodynamic instability will be controlled by transfusion of blood (from placenta) immediately after birth, intravenous infusion of saline combined with electrolytes, and if necessary inotropic agents.
- Adequate enteral and parenteral feeding strategies will prevent hypoglycemia, which is checked regularly in combination with blood gas analysis and other electrolytes.
- Infections are prevented by:
  - o aseptic surgical techniques
  - o strict hygiene and disinfection protocols during procedures and around vascular catheters
  - o prevention of cross contamination between animals
  - o personal hygiene measures
  - o daily cleaning and disinfection of the intensive care environment

- Prophylactic antibiotics
- Culture of vascular catheter line tips incl. antibiogram to ensure proper use of antibiotics, but also reduce the risk for resistance.
- Malnourishment will be prevented by continuous monitoring of 'eating behavior', manual feeding if necessary, and offering a varied diet. Proper feeding will also prevent postnatal gastro-intestinal complications.
- Formation of urinary calculi is prevented by ensuring adequate oral intake of fluids, especially water, infection prevention and a well-balance mineral intake (phosphorus and calcium) in the form of pellet food and hay grass. Regular assessment of urine sediment is performed to assess potential formation of calculi.
- Arthritis can be prevented by proper infection prevention. In addition, regular disinfection of the umbilical cord is important.
- Shortness of breath will be prevented by regular pulse oximetry measurements in combination with auscultation of the lungs. If the lambs is hypoxic, oxygen supplementation treatment can be applied in combination with nebulization of medicaments to (1) ease the work of breathing and (2) to tackle underlying causes such as mucus plugs.

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

### Humane endpoints for ewes

- Pending preterm labor
- Intra-uterine fetal death (checked by absence of fetal blood pressure, and blood pH<6.8)
- Sepsis/ infection not responding to treatment
  - Local (at the site of catheter exit in flank): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint.
  - Systemic: Combined and persistent signs of infection (elevation of the body-temperature plus tachypnea or high pulse plus impaired feeding), lethargy, excessive time lying down -> evaluation by researcher in consult with veterinarian
- Maternal metabolic problems (pregnancy toxemia). Insufficient intake of food can lead to decreased blood glucose levels and subsequent ketosis. Food intake and gastro-intestinal activity (rumination, rumen sounds, borborygme, and defecation) should be monitored daily. The cause of decreased food intake (e.g. post-operative pain) should be investigated with help of a veterinarian. If a ewe does not respond to treatment of decrease blood glucose (IV glucose or Propylene glycol) and/or pain medication a HEP is reached.
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)  
Assessment of pain:
  - Lack of appetite
  - Grinding of teeth
  - Reluctance to stand/ excessive time lying down
- Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort

### Humane endpoints for fetus (*in utero*)

- Hypoxia-ischemia (decreased blood-pressure, decreased heart rate, decreased blood pH (<7.0), elevated blood CO<sub>2</sub>, decreased blood O<sub>2</sub> and saturation)
- Severe sepsis leading to hypotension and severe metabolic acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis.

### Humane endpoints for lamb (short-term postnatal and cell tracing)

- Unsuccessful (re-)intubation mandating tracheotomy:

- Intubation complicated by vocal cord spasms can lead to severe respiratory distress. Intubation is always performed under supervision of a highly trained personnel member and/or a neonatologist. In case of a vocal cord spasm, specific medication can be used to reduce or prevent spasm. If intubation remains impossible, the lamb can be intubated by tracheotomy. However, tracheotomy in animals that are awake causes severe discomfort and therefore continuous sedation is needed that influences the outcome of the fetus. In addition, lambs that have undergone tracheotomy are not eligible for postnatal survival since the procedure of restoration of the tracheotomy causes severe discomfort. As such, we defined this as a HEP
- Pneumothorax:
  - Blood gas analysis (pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>), saturation (pulse oximetry): these parameters are monitored and documented. Target ranges are defined to control ventilation and to identify need for surfactant re-dosing. Rapid changes indicate ventilation complications such as pneumothorax or atelectasis, which can be verified by auscultation, ultrasound or chest X-ray. Pneumothorax may be treated by means of a thorax drain. Pneumothorax can dramatically impair fetal well-being with continuous severe discomfort. Moreover, pneumothorax, regardless of treatment, is a confounder in the experiment that will critically influence experimental outcomes.
- Uncorrectable severe acidosis:
  - Severe acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis which cannot be corrected by Sodium bicarbonate treatment is considered a HEP.
- Sepsis with uncorrectable hypovolemia
  - Severe sepsis leading to hypotension (MAP < 20 mmHg) and severe acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis is a humane endpoint.
- Multi-organ failure

#### **Humane endpoints for lamb (long-term)**

- Congenital malformations that are not compatible with long-term survival (anatomical malformations, extreme low birth weight for GA (<60% of average weight for GA))
- Unsuccessful weaning of ventilator support
  - FiO<sub>2</sub> > 0.50 at 72 hours of ventilation
  - SaO<sub>2</sub> < 80% for more than 1 hour with a maximal flow of 15L/min and FiO<sub>2</sub> of 1.0
  - Extubation failure after a third weaning attempt.
  - Need for O<sub>2</sub> treatment of ventilator support 7 days after extubation.
- Untreatable Infection/inflammation:
  - Local (e.g. after venipuncture): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint.
  - Systemic: Combined and persistent signs of infection (elevation of the body-temperature plus tachypnea or high pulse rate plus impaired feeding), lethargy, excessive time lying down -> evaluation by researcher in consult with veterinarian
- Gastro-intestinal (untreatable bloat)
- Failure to thrive
  - Insufficient weight gain with respect to size and body composition. Normal growth for term Texel lambs during suckling is 300 g/day. Due to prematurity, growth rates might be lower in our experiment. The lambs are weighed every day and measured weekly (crown-rump length) and growth curves will be made. If weight (gain) in relation to growth of the lamb stagnates or decreases >20% this will be a humane endpoint.
  - Inability to independently reach food and water
- Urinary calculi leading to obstruction of urethra and inability to void bladder. In case treatment (urinary catheter insertion and bladder flush) is not possible or with recurrent obstruction.
- Unsuccessful recovery from anesthesia during 2 month MRI:
  - FiO<sub>2</sub> > 0.40 at 12 hours post MRI
  - SaO<sub>2</sub> < 80% for more than 1 hour with a maximal flow of 15L/min and FiO<sub>2</sub> of 1.0
  - Extubation failure after a second weaning attempt.
  - Need for O<sub>2</sub> treatment of ventilator support 72 days after extubation.
-

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

Ewe: 10%  
 Lambs short-term and 72 hours cell tracing: 20%  
 Lambs 12 hour cell tracing: 10%  
 Lambs long-term non-exposed: 30%  
 Lambs long-term LPS-exposed :35%  
 Term born reference controls: 5%

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

We have summarized all procedures that might influence the discomfort of the ewes and lambs with the corresponding estimated discomfort:

Procedure	Frequency	Discomfort	
<b>Antenatal/ in utero:</b>			
		<b>Ewe:</b>	<b>Fetus/lamb:</b>
Pre-anesthesia check incl. ultrasound	1x	Mild	None
Instrumentation under general anesthesia	1x max 2 hours	Moderate	Mild
Postoperative antibiotics (intramuscular)	4 days 2dd	Mild	n/a
Intra-amniotic exposure to LPS	1x	Mild	Mild
Corticosteroids injection (intramuscular)	1x	Mild	
C-section (modified EXIT, including intubation and if needed (long term study) placement vascular catheters) under general anesthesia	1x max 30 minutes	Mild	Short-term and tracing: Mild  Long-term: mild-moderate
Spontaneous birth (term born references)	1x	Mild	n/a
Euthanasia (general anesthesia)	n/a	Non-recovery	n/a
<b>LICU:</b>			
Mechanical ventilation (no sedation)	72 hours	n/a	Moderate
Intravenous administration stem cells in pre-existing catheter	1x	n/a	None
Blood drawing in pre-existing catheters for bloodgas (0.2 mL)	>10x	n/a	None
Blood drawing for laboratory analysis (pre-existing catheter)	1x during C-section (2mL) 2x (daily) via pre-existing catheters (2mL)	n/a	None
Finger feeding	Every 2-4 hours	n/a	Mild
EEG	Continuous 72 hours	n/a	Mild
Ultrafast Doppler ultrasound (in rest/sleep)	Max 3x 15 minutes	n/a	Mild
Euthanasia (only short term and tracing; under sedation)	1x	n/a	Mild
<b>Long-term postnatal:</b>			
Weaning off ventilator support		n/a	Mild/Moderate

MRI (general anesthesia)	1x at 2 months (including recovery)	n/a	Moderate
	1x at 12 months (end of experiment)		Non-recovery
Blood collection	1x during C-section (general anesthesia)	n/a	None
	9x in stable		Mild/moderate
	2x during MRI under general anesthesia		None
EEG	2x during MRI (general anesthesia)	n/a	Mild
Ultrafast doppler	2x during MRI (general anesthesia)	n/a	Mild
Gait analysis incl. training	At 8 and 12 months	n/a	Mild
Maze testing incl. training	At 8 and 12 months	n/a	Mild
Euthanasia (general anesthesia MRI)	1x	n/a	Mild

Ewe: **moderate** (recovery after abdominal surgery, euthanasia immediately after C-section under general anesthesia)

Ewe (term born references): **mild** (delivery of lambs)

Lamb short-term: **moderate** (mechanical ventilation under minimal sedation)

Lamb long-term: **moderate** (mechanical ventilation with minimal sedation, postnatal survival incl. anesthesia for MRI, blood collection, and other experimental procedures)

Lambs term reference control: **moderate** (anesthesia for MRI, blood collection, and other experimental procedures)

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p><b>Replacement:</b></p> <p>Animal experiments are needed because the patients for who this new therapy is developed are premature babies, who are extremely vulnerable and susceptible for injury and organ damage with potential life-long consequences. Currently there are no suitable alternatives for the complex events of antenatal infection/inflammation (chorioamnionitis), preterm birth and postnatal intensive care. In this is a translational study, the contribution of a multitude of organ systems that are involved in the pathogenesis of EoP will be studied. This in combination with multiple application routes and long-term functional outcomes cannot be assessed solely <i>in vitro</i>. Moreover, the required biological samples to assess the outcome parameters cannot be sampled from humans. Importantly, we use state-of-the-art culture techniques (organoids) from postmortem acquired tissues from sheep and human tissues acquired during surgery to investigate sub-questions in this project. However, these <i>in vitro</i> assays cannot replace the complex setting of EoP, thereby mandating animal experiments.</p>
Vermindering	<p><b>Reduction:</b></p> <p>Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to reduce drop-out rates. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between gender since our clinical population consists of both sexes.</p>



	<p>With the use of state of the art culture techniques (organoids from post-mortem tissues), we are able to answer research questions that initially would require additional animals.</p> <p>By using non-invasive techniques such as MR imaging, we enable longitudinal assessment of neurodevelopment in a single animal that would otherwise only be possible postmortem.</p> <p>We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 22 animals. Moreover, we will combine our long-term control groups for IV and IN administration, as the effects of both sham treatments (IV saline or IN saline) can be ignored.</p>
Verfijning	<p><b>Refinement:</b></p> <p>The choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, the developmental biology of sheep and humans is very similar. For example, white matter myelination in lambs and humans starts before birth, compared to rodents in which this process starts postnatal. Therefore, we have established an animal model of immature neurodevelopment in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice.</p> <p><u>Ewe:</u></p> <p>We have adjusted post-operative housing requirements from solitary housing to group housing. This has resulted in reduced postoperative complications, including infection, motility abnormalities and fetal demise. Moreover, group housing has improved well-being of the ewes as these conditions enable natural behavior.</p> <p>Our experiments will be conducted by a highly trained staff that has been trained to recognize and act upon discomfort such as pending labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.</p> <p><u>Lambs:</u></p> <p>Ventilation with sedation on indication in combination with positioning of the fetus in a sling with free movement of the legs enables the lamb to maintain blood pressure and prevent complications associated with alterations in blood pressure such as edema and capillary leakage. In addition, presence of a suckling reflex will enable peristalsis and therefore make enteral feeding with colostrum possible, which is essential for survival and well-being of the newborn lamb.</p> <p>We keep all lambs as much as possible in groups (minimal 2) to ensure more natural behavior (less focus and reliance on humans) and reduced stress.</p> <p>Furthermore, the lambs on the lamb intensive care unit are continuously monitored 24 hours/day by a highly trained and experienced team enabling early recognition of complications and discomfort and to act upon recognition. Moreover, we have actively acquired input from clinical professionals (nurses) who work on the Neonatal Intensive care Unit with regard to hygiene, infection prevention, medication, and use of reusables/disposables. This has resulted in reduced number of infections and increased neonatal survival.</p>
Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?	
<input checked="" type="checkbox"/> Nee	
<input type="checkbox"/> Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.	

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

### I. Herhaling

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

n/a

### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

The ewes that give birth (natural delivery) to the term reference control lambs, will be offered for adoption.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Ewe: all ewes will be euthanized at the end of the experiment since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection and abdominal surgery.

Lambs: all lambs will be humanely euthanized at the end of the experiment as postmortem laboratory analyses of tissues and organs is crucial to determine our outcome parameters.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

All animals will be euthanized by an intravenous injection with an overdose sodium pentobarbital following sedation/general anesthesia.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

---

Naam van het project	Stamceltherapie voor de behandeling van hersenschade bij te vroeg geboren baby's
NTS-identificatiecode	NTS-NL-590991 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Vroeggeboorte Stem cellen Hersenschade
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Van alle kinderen in Nederland wordt ongeveer 7% te vroeg geboren. Er is sprake van vroeggeboorte indien de zwangerschap korter duurt dan 37 weken. Naast de onvolledige ontwikkeling van organen ten gevolge van de vroeggeboorte, dragen vruchtwaterinfecties ook direct bij aan een verstoorde orgaanontwikkeling waaronder het brein bij het ongeboren kind. Daarnaast zijn de longen van vroeggeboren baby's vaak onrijp waardoor de ademhaling na de geboorte ondersteund moet worden op een Neonatale Intensive Care Unit. Echter, ondanks dat ondersteuning van de ademhaling door middel van mechanische ventilatie levensreddend is, kan bijdragen aan blijvende schade aan de hersenen van deze kinderen.</p> <p>In dit project wordt onderzocht in een schapenmodel of deze ontwikkelingsachterstand behandeld kan worden met behulp van stamcellen. De stamcellen die in dit project worden getest hebben twee belangrijke eigenschappen: (1) ze kunnen ontstekingsreacties die ten grondslag liggen aan hersenschade bij vroeggeborenen remmen; en (2) ze kunnen het lichaamseigen weefselherstel bevorderen. Gebruik makende van deze twee eigenschappen, zullen wij zullen onderzoeken welke toedieningsroute van stamcellen; zijnde in de bloedbaan of door middel van neusdruppels het beste werkt op specifieke momenten in het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen. Wij verwachten dat toediening via de bloedbaan namelijk meer ontstekingsremmend zal werken en dat toediening van via neusdruppels zal meer weefselherstellend zal zijn. Ook zullen wij de effecten onderzoeken van een combinatie van de twee toedieningsroutes. Naast het testen van verschillende toedieningsroutes op verschillende tijdstippen in het ziekteproces, zullen wij de toegediende cellen opvolgen om inzicht te krijgen waar ze in het lichaam naar toe gaan, hoe lang ze in het lichaam blijven en hoe ze exact werken.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op	<p>Dit onderzoek levert inzichten op over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan het brein na vroeggeboorte. Naast onderzoek van het brein zullen in dit onderzoek ook gegevens worden verzameld van andere orgaansystemen. We verwachten meer inzichten te verkrijgen in het ontstaan van schade van meerdere organen bij vroeggeborenen, leidend tot meer gerichte aanknopingspunten voor aanvullende behandelingen.</p>

lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De schapen zullen een operatieve ingreep onder algehele narcose ondergaan. Tijdens deze operatie zullen katheters worden geplaatst in de bloedvaten van de foetus. In een later stadium zal een vruchtwaterinfectie worden opgewekt door middel van een injectie van een bacterieel bestanddeel in het vruchtwater via een katheter die tijdens de bovengenoemde operatie is geplaatst. Het lam zal middels een keizersnede onder algehele narcose worden geboren. Tijdens de keizersnede zullen extra infusen worden geplaatst en een buisje in de keel worden geplaatst waardoor het lam op de intensive care kunstmatig beademd wordt. Op de intensive care zal het lam naast kunstmatige beademing, medicatie toegediend krijgen via de aangelegde infusen. De lammeren (zowel vroeggeboren als voldragen) die opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen tweemaal onder algehele narcose een MRI scan ondergaan. Tevens zal bij de lammeren maandelijks een bloedafname worden gedaan.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De schapen zullen een operatieve ingreep ondergaan die kan leiden tot wondpijn. Een infectie in het vruchtwater kan fysiek ongerief voor de foetus veroorzaken. Echter, tijdens de zwangerschap is het bewustzijnsniveau van de foetus gering, waardoor dit ongerief niet als dusdanig ervaren zal worden. De oaien zullen, evenals de mens, geen symptomen of ongerief ondervinden van een vruchtwaterinfectie. De oaien zullen een keizersnede ondergaan onder algehele narcose. De foetussen worden na de vroeggeboorte verzorgd op een neonatale intensive care unit en zullen kunstmatig beademd worden. Dit kan leiden tot ongerief in de vorm van pijn en benauwdheid. Door adequate pijnstilling en ventilatie strategieën uitgevoerd door getraind personeel zal dit tot een minimum beperkt blijven. In gedeelte van de vroeggeboren schapen zal de kunstmatige beademing worden gestopt en deze lammeren zullen opgroeien tot volwassen leeftijd. Gedurende deze periode waarin de lammeren opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen deze lammeren onder algehele narcose een MRI-scan ondergaan van het brein.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Schapen (<i>Ovis aries</i>)</td> <td>304</td> <td>0</td> <td>12</td> <td>292</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	304	0	12	292	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	304	0	12	292	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Schapen (<i>Ovis aries</i>)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	12					
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	12														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Na de experimentele procedure zullen de oaien en de lammeren op humane wijze worden gedood om weefsels voor verder laboratoriumonderzoek te verkrijgen. Een deel van de oaien zal natuurlijk bevallen van een lam. Deze oaien zullen na afloop van het experiment ter adoptie worden aangeboden.</p>																

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

In het huidige experiment bootsen we de klinische situatie na van een vruchtwaterinfectie (chorioamnionitis), vroeggeboorte en zorg voor vroeggeborenen op een intensive care. Al deze elementen dragen bij aan het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen en dit ziekteproces, waarin een groot aantal orgaansystemen betrokken zijn, proces kan nog niet nagebootst worden middels proefdiervrije alternatieven of knaagdieren. Belangrijk is dat we gebruik maken van weefsels van schapen die postmortaal verkregen zijn en weefsel van mensen die tijdens de operatie zijn verkregen om onderzoeksvragen te beantwoorden die in eerste instantie aanvullende dierproeven zouden vereisen.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Door ruime ervaring met schapen en het verzorgen van lammeren op de lammeren intensive care unit zijn wij in staat om uitval te beperken. Onze experimenten worden uitgevoerd door zeer ervaren personeel volgens gevestigde protocollen. Deze methoden zijn in het voordeel van reproduceerbaarheid en gebruik van eerder verkregen historische gegevens en voorkomen onnodig gebruik en verlies van dieren. Bovendien maken we geen onderscheid tussen geslacht, aangezien onze klinische populatie uit beide geslachten bestaat. Door gebruik te maken van niet-invasieve technieken zoals MRI-scans, kunnen we de hersenontwikkeling herhaaldelijk in één enkel dier bestuderen zonder dat een dier hiervoor zal komen te overlijden. Hierdoor kunnen wetenschappelijke inzichten vaker en met minder dieren verworven worden. Door de voorgestelde experimenten om de stamcellen op te volgen uit te voeren in dezelfde dieren als nodig zijn voor de voorgestelde korte termijn experimenten, kunnen we het aantal benodigde dieren verminderen.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Ooi:  
We hebben de huisvesting na de operatie voor de ooiën aangepast van individuele huisvesting naar groepshuisvesting. Dit heeft geleid tot minder postoperatieve complicaties, waaronder infectie, een verbeterde werking van het maag-darm-stelsel, en minder overlijden van de foetus. Bovendien heeft groepshuisvesting het welzijn van de ooiën verbeterd, aangezien deze omstandigheden natuurlijk gedrag mogelijk maken.  
Onze experimenten zullen worden uitgevoerd door hoog opgeleid personeel dat is opgeleid om klinische verschijnselen, zoals in spontane weeën en vroeggeboorte, te herkennen en erop te reageren. Erkenning van spontane bevalling verkleint de kans op complicaties en verbetert het dierenwelzijn.

Lammeren:  
Tijdens kunstmatige beademing zullen de lammeren in een hangmat worden geplaatst. Deze hangmat maakt het mogelijk voor het lam om te bewegen, waardoor de bloeddruk bloeddruk op peil gehouden kan worden en de gevolgen van bloeddrukschommelingen voorkomen voorkomen kunnen worden. Bovendien zal de aanwezigheid van een zuigreflex de peristaltiek mogelijk maken en daardoor voeding met moedermelk mogelijk maken, wat essentieel is voor de overleving en het welzijn van het pasgeboren lammetje.  
We houden alle lammeren zoveel mogelijk in groepen om te zorgen voor natuurlijker gedrag, minder stress en minder focus op en afhankelijkheid van de mens.  
de experimenten op de intensive care voor vroeggeboren lammeren worden uitgevoerd door hoog opgeleid personeel zoals klinische professionals (neonatologen en verpleegkundigen) die normaliter werkzaam zijn op de Neonatale Intensive Care. Dit heeft geresulteerd in een verminderd aantal infecties en een verhoogde neonatale overleving.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

De keuze van het diermodel is gebaseerd op de lichaamsgrootte, gebruik van vergelijkbare apparatuur als op de neonatale intensive care en grote overeenkomsten in de ontwikkelingsbiologie tussen mensen en schapen. Hierdoor kunnen bevindingen in ons diermodel kunnen eenvoudig worden vertaald naar de klinische praktijk. De leeftijd van de foetus is gekozen omdat dit een overeenstemming is met de hersenontwikkeling en de longontwikkeling van de grootste groep vroeggeborenen in het ziekenhuis.



**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	01-03-2022
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	28-02-2027
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** donderdag 31 maart 2022 16:45  
**Aan:** Braunstahl, drs. F. (Ferry)  
**CC:** Info-zbo  
**Onderwerp:** Buitengewoon aanvraag

**Categorieën:** Dossier: 5.1 lid2e

Geachte dhr. Braunstahl, geachte leden van het CCD

Dames en heren,

Ik richt me vandaag tot u met een buitengewone aanvraag en verzoek.

Het gaat om een goedgekeurd project met het nummer AVD\_5.1 lid2h

5.1 lid2h

Bepaalde experimentgroepen van dit PL konden niet worden uitgevoerd zoals gepland (AVD\_5.1 lid2h\_2022-15869) door factoren waar de aanvrager geen invloed op had (corona-gerelateerde detachering medisch personeel, afwezigheid personeel wegens ziekte). De hiervoor benodigde dieren zijn echter wel ingezet en op zeer korte termijn beschikbaar vanwege de lang van tevoren gemaakte planning (tijdgebonden, drachtige schapen).

Het zou echter mogelijk zijn (in verband met de beschikbaarheid en inzet van de medisch verzorgers) om de dieren te gebruiken in experimenten die worden aangevraagd in een PL dat nu ter beoordeling bij de CCD ligt (AVD\_5.1 lid2h\_2022\_15869) en dat, gezien de gebruikte technieken/interventies, overeen komt met het reeds goedgekeurde project AVD\_5.1 lid2h, alleen de wetenschappelijke vraag is anders, gebaseerd op de eerderverkregen resultaten.

Het secretariaat van de CCD heeft mij laten weten dat het betreffende project door u, de CCD, op vrijdag 8 april 2022 in de reguliere vergadering zal worden behandeld.

Mijn verzoek aan u is zeker niet alledaags, maar juist vanwege de uiterst complexe voorbereidingstijd voor het lopende project en de beschikbaarheid van de drachtige dieren, die op een intensieve en complexe manier zijn voorbereid zoals hierboven beschreven, zou ik u willen vragen of het mogelijk is om het PL te beoordelen vóór de geplande datum op vrijdag 8-04-22, het laatste 6-04-22.

Ik zou het op prijs stellen als u mijn verzoek positief zou kunnen beantwoorden.

Als uw vragen hebt, sta ik altijd tot je beschikking!

Hoogachtend,

5.1 lid2e

5.1 lid2e [redacted]

5.1 lid2e [redacted]  
5.1 lid2e [redacted]  
5.1 lid2h [redacted]

5.1 lid2e [redacted]  
5.1 lid2h [redacted]  
5.1 lid2e [redacted]  
5.1 lid2h [redacted]  
5.1 lid2e [redacted]

5.1 lid2h [redacted]  
[redacted]

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 1 april 2022 10:45  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** Braunstahl, drs. F. (Ferry)  
**Onderwerp:** RE: Buitengewoon aanvraag

Geachte 5.1 lid2h

Hartelijk dank voor uw toelichting bij uw verzoek aan de CCD om uw aanvraag 6 april te bespreken. Helaas is dit niet mogelijk. Uw aanvraag zal 8 april tijdens de CCD vergadering besproken worden.

Als ik het goed begrijp, wilt u graag dieren die op het project (vergund onder AVD 5.1 lid2h) staan, inzetten in het nieuw ingediende project (AVD 5.1 lid2h 202215869) wegens onvoorziene planning. Hiervoor wilt u dat een besluit op het nieuw ingediende project voor 6 april geschiedt. Het behandelen van aanvragen met spoed gebeurt allen in het geval er sprake is van een onvoorziene situatie of uitzonderlijk geval die gezien de ernstige risico's voor de volksgezondheid, de maatschappij of het milieu, zodanig acuut is dat een snelle beoordeling door de CCD noodzakelijk is. Uw aanvraag valt hier niet onder. Helaas is het niet mogelijk besluiten te nemen voordat aanvragen worden behandeld in de vergadering.

Daarnaast zou ik u, wellicht in overvloed, willen wijzen op het feit dat de aanvraag AV 5.1 lid2h een doorlooptijd heeft tot en met 1 januari 2023. De doorlooptijd van deze aanvraag is in juni 2020 met een jaar verlengd.

Mochten er nog vragen zijn, hoor ik deze graag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 7890789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**From:** 5.1 lid2e  
**Sent:** donderdag 31 maart 2022 16:45  
**To:** Braunstahl, drs. F. (Ferry) 5.1 lid2e  
**Cc:** Info-zbo <zbo-ccd@rvo.nl>  
**Subject:** Buitengewoon aanvraag

Geachte dhr. Braunstahl, geachte leden van het CCD

Dames en heren,

Ik richt me vandaag tot u met een buitengewone aanvraag en verzoek.

Het gaat om een goedgekeurd project met het nummer AVD\_ 5.1 lid2h .

5.1 lid2h

5.1 lid2h

Bepaalde experimentgroepen van dit PL konden niet worden uitgevoerd zoals gepland (AVD\_5.1 lid2h\_2022-15869) door factoren waar de aanvrager geen invloed op had (corona-gerelateerde detachering medisch personeel, afwezigheid personeel wegens ziekte). De hiervoor benodigde dieren zijn echter wel ingezet en op zeer korte termijn beschikbaar vanwege de lang van tevoren gemaakte planning (tijdgebonden, drachtige schapen).

Het zou echter mogelijk zijn (in verband met de beschikbaarheid en inzet van de medisch verzorgers) om de dieren te gebruiken in experimenten die worden aangevraagd in een PL dat nu ter beoordeling bij de CCD ligt (AVD\_5.1 lid2h\_2022\_15869) en dat, gezien de gebruikte technieken/interventies, overeen komt met het reeds goedgekeurde project AVD\_5.1 lid2h, alleen de wetenschappelijke vraag is anders, gebaseerd op de eerderverkregen resultaten.

Het secretariaat van de CCD heeft mij laten weten dat het betreffende project door u, de CCD, op vrijdag 8 april 2022 in de reguliere vergadering zal worden behandeld.

Mijn verzoek aan u is zeker niet alledaags, maar juist vanwege de uiterst complexe voorbereidingstijd voor het lopende project en de beschikbaarheid van de drachtige dieren, die op een intensieve en complexe manier zijn voorbereid zoals hierboven beschreven, zou ik u willen vragen of het mogelijk is om het PL te beoordelen vóór de geplande datum op vrijdag 8-04-22, het laatste 6-04-22.

Ik zou het op prijs stellen als u mijn verzoek positief zou kunnen beantwoorden.

Als uw vragen hebt, sta ik altijd tot je beschikking!

Hoogachtend,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



## Advies aan CCD


Datum 31 maart 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215869

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity  
 Aanvraagnummer: AVD202215869  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<p><b>Proces</b></p> <p></p>	<p>Vraag over de bijlage dierproeven:</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven aan dat de pasgeboren lammeren individueel gehuisvest worden op de intensive care unit. Daarnaast geeft u ook aan dat er een kans is dat dieren later individueel gehuisvest kunnen worden mocht een deel van de groepsgenoten uitvallen. Kunt u het ongerief dat de dieren ondergaan tijdens de individuele huisvesting van zowel de huisvesting op de ICU als later na scheiden van groepsgenoten meenemen in de tabel ongeriefbepaling onder 'F. Classificatie van ongerief'?</p> <p>Vraag over het projectvoorstel:</p> <p>In communicatie met de DEC heeft de DEC u verzocht aan te geven of het weghalen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kunnen zijn bij de ontwikkeling van de lammeren. Kunt u met referenties en/of eerdere data aangeven waarom dit, volgens u, niet het geval zou zijn?</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

# Overzicht van opmerkingen bij 12. AdviesNotaCCD - 5.1 lid2e \_met opmerkingen.pdf

---

Pagina: 1

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 1-4-2022 14:06:25

---

NTS:

negatieve gevolgen wordt het doden van de diern niet benoemd.

Ook vind ik de laatste alinea nogal verwarren. Ik zou ze vragen om die op te helderen. Wat is het verschil tussen de 2 groepen vroeggeboren lammeren?

Er staan ook nog wel wat taalfouten in, di emogen ze er wel uithalen.

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>				
	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )		304	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival

Citaat:

During birth and shortly after birth (72 hours) of term reference controls, the ewes are housed individually. Individual housing, and later with the newborn lamb will reduce stress during labor, promote bonding between the mother and the lamb and enables researchers and caretakers to closely monitor feeding behavior of the newborn lamb.

Due to infection risks, we keep lambs from different experimental batches separate until they are vaccinated for the first time. We strive to have 3-4 lambs per batch, but in case the majority of animals from a single batch dies, the remaining animal needs to be placed in a new group. However, this will always be in consultation with the animal welfare officer/veterinarian who will assess the risks of placement in a new group. Until this assessment has been done, or in case the health risks are too big, the lamb will remain in individual housing, but within olfactory, auditory and visual distance of the other lambs.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival

Schapen (*Ovis aries*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat:  
We will use pregnant ewes (female) and fetuses/lambs of both genders

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat vraag 31 DEC aan aanvrager: Het is onduidelijk of de lammetjes die aan de mechanische ventilatie liggen wakker zijn of onder anesthesie?</p> <p>Citaat antwoord van aanvrager op vraag 31: De lammeren zullen tijdens mechanische ventilatie wakker zijn om de volgende reden: In voorgaande experimenten waarin lammeren 72 uur beademd werden, zijn wij complicaties tegen gekomen die uiteindelijk hebben geleid tot een humaan eindpunt. Deze complicaties waren als volgt: Na 48 uur maken alle lammeren een periode door die gekenmerkt wordt door (1) hypotensie; (2) capillary</p>
-------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



leakage en oedeem; (3) afwezigheid van maaglediging en (4) metabole acidose.

Wij hebben de beschreven complicaties besproken met Prof. Jane Pillow (University of Western Australia). Zij is expert in ventilatiemodellen en op basis van haar advies hebben wij de volgende aanpassingen succesvol doorgevoerd.

Door de houding van de lammeren te wijzigen van buik- en zijligging naar een buikligging in een hangmat met vrije beweeglijkheid van de poten in combinatie met sedatievrije beademing zal het lam in staat zijn om zelfstandig zijn bloeddruk en de complicaties gerelateerd aan bloeddrukschommelingen onder controle kunnen houden.

Door de lammeren tijdens de beademing niet te sederen hebben ze een zuigreflex waardoor ze actief gevoed kunnen worden, wat zal resulteren in adequate maaglediging en peristaltiek en daardoor preventie van o.a. metabole acidose. Daarnaast is peristaltiek en opname van o.a. antilichamen uit biest (colostrum) in de eerste 72 uren na de geboorte cruciaal voor de overlevingskans van lammeren, en vroeggeboren lammeren in het bijzonder.

Citaat C9:

- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

De pasgeboren lammeren zullen sedatievrij worden beademd op de intensive care unit. De 5.1 lid2h heeft hierover een vraag gesteld aan de onderzoekers. De onderzoekers geven aan dat de keuze hiervoor een verfijning is o.b.v. eerdere ervaringen met het model. Door lammeren niet te sederen is het lam in staat om zelf fysiologische parameters zoals bloeddruk en maagperistaltiek te reguleren. Dit heeft positieve effecten op het welzijn en de overleving van de lammeren.


Citaat C10:

De 5.1 lid2h heeft zich ervan verzekerd dat dit het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt J in de bijlagen. Er wordt naar gestreefd om alle dieren in groepen te huisvesten, maar oaien zullen rondom de geboorte tijdelijk kortdurend apart worden gehuisvest om complicaties te voorkomen. Er is een kleine kans dat opgroeiende lammeren tijdelijk alleen gehuisvest zijn, als alle groepsgenoten zouden uitvallen en er een nieuwe groep gevormd moet worden.

Citaat C18:

De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke lammeren. Uiteraard kunnen alleen drachtige oaien worden

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 1-4-2022 14:01:48  
beide geslachten dus geen bijzonderheid. Zou ik denk ik weglaten.

gebruikt.

Citaat vraag 15b DEC aan aanvrager:

Zou het daarmee mogelijk zijn om de oaien in de controlegroep niet te hoeven doden, en aan te bieden voor adoptie. In de veehouderij komt een keizersnede ook regelmatig voor en is dat niet per sé een reden om een ooi te doden.

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 15b:

De lammeren worden preterm via keizersnede geboren. De keizersnede zelf gebeurt onder volledige anesthesie. Voor de ooi zelf betekent dit gering ongerief. Indien de ooi moet bijkomen uit anesthesie en herstellen van de keizersnede, zal ze meer ongerief ondervinden: minimaal matig de eerste dagen na de ingreep gradueel afnemend naar gering tot volledig herstel. Daarnaast zal tijdens de keizersnede ook de alle wonden t.g.v. de instrumentatie (uittredeplaatsen katheters in baarmoeder en flank) moeten worden hersteld. Daarbij is het risico op complicaties na keizersnede voor de ooi verhoogd, met name omdat de keizersnede gebeurt op een moment dat de ooi nog niet in partus is (vroeggeboorte) en dus baarmoeder en placentomen (cotyledonen) ook nog dysmatuur zijn. Hierdoor kan de nageboorte blijven staan, met als gevolgen een baarmoederontsteking. Hierdoor kan de herstelperiode na operatie verlengd zijn met langer en hoger ongerief voor het dier.

Een ander aspect is de vraag wat met de oaien zou gebeuren als ze in leven gelaten worden en het herstel van de operatie hebben doorgemaakt. Hergebruik in een ander experiment zou opnieuw lijden tot ongerief. Op dit moment zijn er ook geen lopende onderzoeken in volwassen schapen in onze instelling. Uit eerdere ervaring uit ons onderzoeksgroep heeft de net doorgemaakte zwangerschap ook invloed op een aantal fysiologische parameters. Bij voorbeeld veranderen tijdens de zwangerschap de longen en het cardiovasculair stelsel. Het gebruik van deze dieren in een studie samen met niet zwangere dieren wordt daardoor wel beperkt. Om wel gebruik te maken van de dieren hebben wij in de afgelopen jaren regelmatig lichaamsmateriaal van opgeofferd oaien aangeboden aan andere laboratoria. Op die manier kunnen zij hun lab technieken testen en verfijnen, waardoor de kwaliteit van onderzoek in schapen in de toekomst verbeterd wordt. Verder wordt met lichaamsmateriaal in vitro werk op bepaalde vraagstellingen gedaan, zonder dat extra proefdieren nodig zijn.

Samenvattend, zijn wij daarom van mening dat het bijkomende vermijdbaar ongerief voor het dier zwaarder weegt dan het doel het dier voor een onzekere toekomst in leven te houden.

Citaat C20:

Het grootste gedeelte van de oaien zal moeten worden gedood omdat de gevolgen van het aanbrengen van intra-amniotische katheters, toediening van LPS en de gevolgen van de keizersnee te veel ongerief veroorzaken en hergebruik in de weg staan. De 5.1 lid2h heeft de onderzoekers hierover vragen gesteld en de onderzoekers hebben voldoende aannemelijk gemaakt dat overleving van deze oaien niet realistisch is. De oaien die de controle lammeren op de normale tijd en manier ter wereld brengen zullen niet worden gedood en ter adoptie worden aangeboden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van preterme geboorte, op tegen de opoffering het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan?

2.

o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel  
o Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.

De 5.1 lid2h is van mening dat de belangen van toekomstige te vroeg geboren kinderen en hun naasten die te maken hebben met hersenschade, achterblijvende ontwikkeling of zelfs overlijden, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, die meer inzicht krijgen in de effectiviteit en optimale strategie voor een stamceltherapie binnen het project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot mild ongerief, of de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Alle lammeren en een deel van de oaien zullen opgeofferd worden aan het einde van de experimentele procedures, en worden daardoor de waarde van leven ontnomen. Alleen de oaien die a terme lammeren zullen ter adoptie worden aangeboden. De onderzoekers geven aan dat voor 96% van de dieren het ongerief matig zal zijn, en voor 4% van de dieren mild. De integriteit van de schapen wordt met name aangetast door de keizersnede en het plaatsen van katheters. In een gedeelte van de

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Highlight      Datum: 1-4-2022 13:53:41

5.2 lid1 De ooien kunne prima overleven, maar zullen meer ongereif ondergaan en kunnen waarschijnlijk niet meer ingezet worden voor proeven. Dat is een hele andere ethische discussie dan dat ze geen realistische overlevingskans hebben. Ik zou hier wel even een opmerking over maken in de terugkoppeling.

Ik zou stellen dat de beschrijving onder C20 geen recht doet aan de door de aanvrager aangedragen argumenten.

lammeren zal de ontwikkeling na een aantal maanden gevolgd worden met beeldvormende technieken en gedragstesten. 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.

Wereldwijd worden er jaarlijks 15 miljoen baby's te vroeg geboren, waarvan 12.000 in Nederland. Door vroeggeboorte is er kans op allerlei schadelijke neurologische effecten voor de lange termijn, de Encephalopathy of Prematurity (EoP). Indien de doelstellingen bereikt worden, zullen de onderzoekers kennis vergaren over de effectiviteit en te hanteren strategie van een veelbelovende stamceltherapie voor EoP. Dit onderzoek biedt daarmee perspectief op een meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de **5.1 lid2h** 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.

De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van pre-terme geboorte, op tegen de opoffering, het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan bevestigend. De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening wegen de substantiële belangen van onderzoekers en toekomstige patiëntjes en hun naasten en de reële belangen van de industrie in dit project, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren. De **5.1 lid2h** 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 de voorgestelde 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, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen

aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De 5.1 lid2h 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 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" van een positief advies.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Een minderheidsstandpunt werd ingenomen door een 5.1 lid2h. Dit lid had bezwaren tegen de experimentele opzet van het onderzoek. De onderzoekers hebben niet overtuigend middels data aangetoond dat het zonder ooi opgroeien van pre-term lammeren geen extra confounder creëert ten opzichte van a-term geboren lammeren die opgroeien bij de ooi in relatie tot de uitkomstmaat van cognitieve en locomotieontwikkeling. Hiermee is de wetenschappelijke kwaliteit van het onderzoek in gevaar, en daarmee ook de ethische acceptatie van onderhavig onderzoeksvorstel.

Citaat vraag 17 DEC aan aanvrager:

Zijn lammetjes die a term geboren worden en door de moeder worden grootgebracht een goede /optimale controle? De experimentele groep wordt én te vroeg geboren, én groeit op zonder moeder. Voor de 5.1 lid2h klinkt dit als een dubbel nadeel/dubbele stress voor het gezond (op)groeien van de lammetjes. Zou het op een of andere manier mogelijk zijn om de te vroeggeboren lammetjes ook bij een/hun moeder op te laten groeien? Creëert dit geen confounder m.b.t. ontwikkeling?

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 17:

Het is helaas niet mogelijk om de vroeggeboren lammeren op te laten groeien bij een (surrogaat) moeder omdat de periode tussen geboorte en

hereniging te lang is en de ooi het lam zal verstoten. Daarnaast zijn vroeggeboren lammeren zeer gevoelig voor infecties/ziekten die een ooi van nature bij zich draagt. Op basis van ervaring met lange termijnstudies in schapen door onze en andere groepen zijn wij ervan overtuigd dat moederloze opfok geen confounder is in het experiment.

Citaat bijlage III DEC advies, aanvullende vraag aan aanvrager: Het is duidelijk waarom te vroeggeboren lammeren niet kunnen opgroeien bij een surrogaatmoeder. Het is minder duidelijk waarom u ervoor kiest om de a terme lammeren niet ook zonder moeder te laten opgroeien, anders dan dat dit minder ongerief voor de dieren zal betekenen. Deze keuze lijkt een schonere vergelijking op te leveren, wat is daarop uw visie? U stelt dat u ervan overtuigd bent dat er geen sprake van zal zijn van een confounder effect o.b.v. eerder onderzoek. Kunt u deze stelling in de aanvraag onderbouwen met data of literatuurverwijzingen?

Citaat antwoord aanvrager bijlage III:

In de geplande studie setup vergelijken wij een 'ernstig zieke' groep (LPS-prematuriteit-ventilatie) met een 'zieke' groep (prematuriteit-ventilatie) en een gezonde controlegroep. In de laatste groep is het belangrijk een goede referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt. Hiertoe zijn spontane bevalling op à terme leeftijd en voeding via de moeder meegenomen als natuurlijke elementen om een zo'n best mogelijke start na te bootsen en daarmee een zo gezond mogelijke controlegroep te creëren. Als gunstige bijkomstigheid is er geen sprake van dieren ongerief van de à terme controlegroep. De enige confounder kan ontstaan bij een gedragstest gedragstest; de fles gevoede dieren zijn vanaf de eerste dag gewend aan mensen. Wij zijn ons hiervan bewust en zullen dit ondervangen in het trainen van de dieren. Daarnaast zullen de à terme lammeren ongeveer 2 maanden na geboorte worden gescheiden van de moeder en worden opgenomen in de kudde preterme schapen. Hier zal al een deel van het aangeleerde gedrag van de preterme schapen worden overgedragen naar de à terme lammeren. De gedragstesten zullen plaatsvinden 6 maanden plaatsvinden na samenvoegen van de kudde.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:


Citaat E3:

De 5.1 lid2n had initieel veel vragen bij uitvoeringsaspecten van het project en de invloed daarvan op de waarde van de resultaten. Deze vragen zijn door de onderzoekers uitgebreid beantwoord en hebben tot bijstelling van het voorstel geleid. Er is in de vergadering ook gesproken



	<p>over of deze dierproeven bijdragen aan het verder verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen, en de wenselijkheid daarvan. De onderzoekers is gevraagd hierop te reflecteren. De onderzoekers hebben naast deze reflectie in hun antwoord ook aangegeven dat dit onderzoek niet primair gericht is op extreem te vroeg geboren kinderen maar met name op het kunnen behandelen van onvermijdelijke vroeggeboorten na 28 weken zwangerschapsduur, waarvoor een duidelijke klinische behoefte aan betere therapie bestaat.</p>
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. </p>
-----------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 4 Inhoudelijke beoordeling

#### 3V's

<p>Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	----------------------------------------------

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Dodens volgens richtlijn?
3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival	Ja	volgens de richtlijn.


Naam proef	Ongerief:	
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>		
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	96,0% Matig 4,0% Licht	


### 5 Samenvatting

5.1 lid 2h, 5.2 lid 1

## Pagina: 9

---

 Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Highlight      Datum: 1-4-2022 13:40:22  
Moeten we dei ook niet toevoegen?

 Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 1-4-2022 13:41:51  
Hier moet je ook nog wat uitgebreider ingaan op het minderheidsstandpunten de correspondentie over de onderzoeksstrategie. Ook het dilemma over de implicaties van de onderzoeksresultaten zou je nog even meoten aanstippen.

## 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan geen verdoving/pijnbestrijding toe te dienen bij de pasgeboren lammeren die geïntubeerd worden voor beademing op de intensive care unit in het kader van verfining, zowel de DEC als het

5.2 lid1

Een deel van de pasgeboren dieren zal individueel gehuisvest worden op de intensive care unit en wellicht na het uitvallen van groepsaenoten. 5.2 lid1

5.2 lid1

De aanvrager is gevraagd om het bijkomende ongemak mee te nemen in de ongeriefinschatting in de bijlage dierproeve

In het onderhavige project wordt voor de geboren dieren geen selectie gemaakt op geslacht. Voor de moederdieren zullen vanzelfsprekend enkel vrouwelijke dieren inezet worden. 5.2 lid1

5.2 lid1

De aanvrager geeft aan de dieren die op natuurlijke wijze zullen bevallen van controledieren ter adoptie te zullen aanbieden. 5.2 lid1

5.2 lid1

De DEC stelt als dilemma dat het onderzoek wellicht zou kunnen bijdragen aan het verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen. De onderzoeker heeft aangegeven dat het verleggen van deze grens geen onderdeel uitmaakt van het onderzoek, maar dat resultaten eventueel wel geëxtrapoleerd kunnen worden naar extreem vroeggeborenen. De DEC heeft aangegeven dat de aanvrager voldoende aanvaardbaar heeft gemaakt dat onderzoek naar extreme vroeggeboorte geen onderdeel is van het onderhavige project.






De DEC geeft haar advies op basis van een meerderheidsstandpunt. Een DEC lid kan zich niet vinden in de onderbouwing dat het wegnemen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kan zijn voor de ontwikkeling van deze dieren. 5.2 lid1 De aanvrager is gevraagd data aan te leveren voor dit standpunt.

**6 Voorstel besluit incl. voorstel aeldiaheidsduur van de verauning**

5.2 lid1

## Pagina: 10

---

 Nummer: 1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 1-4-2022 13:44:21
even verwijzen naar vraag 31 van het DEC advies			
 Nummer: 2	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 1-4-2022 14:09:06
tijdelijk			
 Nummer: 3	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 1-4-2022 13:45:27
waarom heb je dat gevraagd? Even inleiden.			
 Nummer: 4	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 1-4-2022 13:45:44
spatie			
 Nummer: 5	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 1-4-2022 13:47:31
eigenlijk zou dit denk ik weg kunnen. Beetje open deur..			

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



# Advies aan CCD

Datum 01 april 2022  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215869

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity  
Aanvraagnummer: AVD202215869  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	<p>vragen over de NTS:</p> <p>In de laatste alinea onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' van uw NTS noemt u dat een gedeelte van de lammeren beademd zal worden. Kunt u in deze alinea ophelderen waarom dit gebeurt en wat het verschil is tussen de verschillende groepen vroeggeboren dieren?</p> <p>Kunt u in uw NTS onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' benoemen dat een deel van de dieren zullen worden gedood?</p> <p>Vraag over de bijlage dierproeven:</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven aan dat de pasgeboren lammeren individueel gehuisvest worden op de intensive care unit. Daarnaast geeft u ook aan dat er een kans is dat dieren later individueel gehuisvest kunnen worden mocht een deel van de groepsgenoten uitvallen. Kunt u het ongerief dat de dieren ondergaan tijdens de individuele huisvesting van zowel de huisvesting op de ICU als later na scheiden van groepsgenoten meenemen in de tabel ongeriefbepaling onder 'F. Classificatie van ongerief'?</p> <p>Vraag over het projectvoorstel:</p>
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	In communicatie met de DEC heeft de DEC u verzocht aan te geven of het weghalen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kunnen zijn bij de ontwikkeling van de lammeren. Kunt u met referenties en/of eerdere data aangeven waarom dit, volgens u, niet het geval zou zijn?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>				
	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )		304	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival

Citaat:

During birth and shortly after birth (72 hours) of term reference controls, the ewes are housed individually. Individual housing, and later with the newborn lamb will reduce stress during labor, promote bonding between the mother and the lamb and enables researchers and caretakers to closely monitor feeding behavior of the newborn lamb.

Due to infection risks, we keep lambs from different experimental batches separate until they are vaccinated for the first time. We strive to have 3-4 lambs per batch, but in case the majority of animals from a single batch dies, the remaining animal needs to be placed in a new group. However, this will always be in consultation with the animal welfare officer/veterinarian who will assess the risks of placement in a new group. Until this assessment has been done, or in case the health risks are too big, the lamb will remain in individual housing, but within olfactory, auditory and visual distance of the other lambs.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival

Schapen (*Ovis aries*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat:  
We will use pregnant ewes (female) and fetuses/lambs of both genders

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat vraag 31 DEC aan aanvrager: Het is onduidelijk of de lammetjes die aan de mechanische ventilatie liggen wakker zijn of onder anesthesie?  Citaat antwoord van aanvrager op vraag 31:
-------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

De lammeren zullen tijdens mechanische ventilatie wakker zijn om de volgende reden:

In voorgaande experimenten waarin lammeren 72 uur beademd werden, zijn wij complicaties tegen gekomen die uiteindelijk hebben geleid tot een humaan eindpunt.

Deze complicaties waren als volgt: Na 48 uur maken alle lammeren een periode door die gekenmerkt wordt door (1) hypotensie; (2) capillary leakage en oedeem; (3) afwezigheid van maaglediging en (4) metabole acidose.

Wij hebben de beschreven complicaties besproken met Prof. Jane Pillow (University of Western Australia). Zij is expert in ventilatiemodellen en op basis van haar advies hebben wij de volgende aanpassingen succesvol doorgevoerd.

Door de houding van de lammeren te wijzigen van buik- en zijligging naar een buikligging in een hangmat met vrije beweeglijkheid van de poten in combinatie met sedatievrije beademing zal het lam in staat zijn om zelfstandig zijn bloeddruk en de complicaties gerelateerd aan bloeddrukschommelingen onder controle kunnen houden.

Door de lammeren tijdens de beademing niet te sederen hebben ze een zuigreflex waardoor ze actief gevoed kunnen worden, wat zal resulteren in adequate maaglediging en peristaltiek en daardoor preventie van o.a. metabole acidose. Daarnaast is peristaltiek en opname van o.a. antilichamen uit biest (colostrum) in de eerste 72 uren na de geboorte cruciaal voor de overlevingskans van lammeren, en vroeggeboren lammeren in het bijzonder.

Citaat C9:

- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

De pasgeboren lammeren zullen sedatievrij worden beademd op de intensive care unit. De **5.1 lid2h** heeft hierover een vraag gesteld aan de onderzoekers. De onderzoekers geven aan dat de keuze hiervoor een verfijning is o.b.v. eerdere ervaringen met het model. Door lammeren niet te sederen is het lam in staat om zelf fysiologische parameters zoals bloeddruk en maagperistaltiek te reguleren. Dit heeft positieve effecten op het welzijn en de overleving van de lammeren.

Citaat C10:

De **5.1 lid2h** heeft zich ervan verzekerd dat dit het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt J in de bijlagen. Er wordt naar gestreefd om alle dieren in groepen te huisvesten, maar ooiën zullen rondom de geboorte tijdelijk kortdurend apart worden gehuisvest om complicaties te voorkomen. Er is een kleine kans dat



opgroeiende lammeren tijdelijk alleen gehuisvest zijn, als alle groepsgenoten zouden uitvallen en er een nieuwe groep gevormd moet worden.

Citaat vraag 15b DEC aan aanvrager:

Zou het daarmee mogelijk zijn om de ooien in de controlegroep niet te hoeven doden, en aan te bieden voor adoptie. In de veehouderij komt een keizersnede ook regelmatig voor en is dat niet per sé een reden om een ooi te doden.

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 15b:

De lammeren worden preterm via keizersnede geboren. De keizersnede zelf gebeurt onder volledige anesthesie. Voor de ooi zelf betekent dit gering ongerief. Indien de ooi moet bijkomen uit anesthesie en herstellen van de keizersnede, zal ze meer ongerief ondervinden: minimaal matig de eerste dagen na de ingreep gradueel afnemend naar gering tot volledig herstel. Daarnaast zal tijdens de keizersnede ook de alle wonden t.g.v. de instrumentatie (uittredeplaatsen katheters in baarmoeder en flank) moeten worden hersteld. Daarbij is het risico op complicaties na keizersnede voor de ooi verhoogd, met name omdat de keizersnede gebeurt op een moment dat de ooi nog niet in partus is (vroeggeboorte) en dus baarmoeder en placentomen (cotyledonen) ook nog dysmatuur zijn. Hierdoor kan de nageboorte blijven staan, met als gevolgen een baarmoederontsteking. Hierdoor kan de herstelperiode na operatie verlengd zijn met langer en hoger ongerief voor het dier.

Een ander aspect is de vraag wat met de ooien zou gebeuren als ze in leven gelaten worden en het herstel van de operatie hebben doorgemaakt. Hergebruik in een ander experiment zou opnieuw lijden tot ongerief. Op dit moment zijn er ook geen lopende onderzoeken in volwassen schapen in onze instelling. Uit eerdere ervaring uit ons onderzoeksgroep heeft de net doorgemaakte zwangerschap ook invloed op een aantal fysiologische parameters. Bij voorbeeld veranderen tijdens de zwangerschap de longen en het cardiovasculair stelsel. Het gebruik van deze dieren in een studie samen met niet zwangere dieren wordt daardoor wel beperkt. Om wel gebruik te maken van de dieren hebben wij in de afgelopen jaren regelmatig lichaamsmateriaal van opgeofferd ooien aangeboden aan andere laboratoria. Op die manier kunnen zij hun lab technieken testen en verfijnen, waardoor de kwaliteit van onderzoek in schapen in de toekomst verbeterd wordt. Verder wordt met lichaamsmateriaal in vitro werk op bepaalde vraagstellingen gedaan, zonder dat extra proefdieren nodig zijn.

Samenvattend, zijn wij daarom van mening dat het bijkomende vermijdbaar ongerief voor het dier zwaarder weegt dan het doel het dier voor een onzekere toekomst in leven te houden.

Citaat C20:

Het grootste gedeelte van de ooien zal moeten worden gedood omdat de gevolgen van het aanbrengen van intra-amniotische katheters, toediening van LPS en de gevolgen van de keizersnee te veel ongerief veroorzaken en hergebruik in de weg staan. De [5.1 lid2h](#) heeft de onderzoekers hierover vragen gesteld en de onderzoekers hebben voldoende aannemelijk gemaakt dat overleving van deze ooien niet realistisch is. De ooien die de controle lammeren op de normale tijd en manier ter wereld brengen zullen niet worden gedood en ter adoptie worden aangeboden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van preterme geboorte, op tegen de opoffering het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan?

2.

o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel

o Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.

De [5.1 lid2h](#) is van mening dat de belangen van toekomstige te vroeg geboren kinderen en hun naasten die te maken hebben met hersenschade, achterblijvende ontwikkeling of zelfs overlijden, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, die meer inzicht krijgen in de effectiviteit en optimale strategie voor een stamceltherapie binnen het project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot mild ongerief, of de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Alle lammeren en een deel van de ooien zullen opgeofferd worden aan het einde van de experimentele procedures, en worden daardoor de waarde van leven ontnomen. Alleen de ooien die a terme lammeren zullen ter adoptie worden aangeboden. De onderzoekers geven aan dat voor 96% van de dieren het ongerief matig zal zijn, en voor 4% van de dieren mild.

De integriteit van de schapen wordt met name aangetast door de keizersnede en het plaatsen van katheters. In een gedeelte van de lammeren zal de ontwikkeling na een aantal maanden gevolgd worden met beeldvormende technieken en gedragstesten. 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.

Wereldwijd worden er jaarlijks 15 miljoen baby's te vroeg geboren, waarvan 12.000 in Nederland. Door vroeggeboorte is er kans op allerlei schadelijke neurologische effecten voor de lange termijn, de Encephalopathy of Prematurity (EoP). Indien de doelstellingen bereikt worden, zullen de onderzoekers kennis vergaren over de effectiviteit en te hanteren strategie van een veelbelovende stamceltherapie voor EoP. Dit onderzoek biedt daarmee perspectief op een meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de [5.1 lid2h](#) 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.

De [5.1 lid2h](#) beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van pre-terme geboorte, op tegen de opoffering, het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan bevestigend. De [5.1 lid2h](#) onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening wegen de substantiële belangen van onderzoekers en toekomstige patiëntjes en hun naasten en de reële belangen van de industrie in dit project, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren. De [5.1 lid2h](#) 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 de voorgestelde 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, zoals duidelijk uit hun voorstel

blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De 5.1 lid2h 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 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" van een positief advies.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Een minderheidsstandpunt werd ingenomen door een 5.1 lid2h lid. Dit lid had bezwaren tegen de experimentele opzet van het onderzoek. De onderzoekers hebben niet overtuigend middels data aangetoond dat het zonder ooi opgroeien van pre-term lammeren geen extra confounder creëert ten opzichte van a-term geboren lammeren die opgroeien bij de ooi in relatie tot de uitkomstmaat van cognitieve en locomotieontwikkeling. Hiermee is de wetenschappelijke kwaliteit van het onderzoek in gevaar, en daarmee ook de ethische acceptatie van onderhavig onderzoeksvorstel.

Citaat vraag 17 DEC aan aanvrager:

Zijn lammetjes die a term geboren worden en door de moeder worden grootgebracht een goede /optimale controle? De experimentele groep wordt én te vroeg geboren, én groeit op zonder moeder. Voor de 5.1 lid2h klinkt dit als een dubbel nadeel/dubbele stress voor het gezond (op)groeien van de lammetjes. Zou het op een of andere manier mogelijk zijn om de te vroeggeboren lammetjes ook bij een/hun moeder op te laten groeien? Creëert dit geen confounder m.b.t. ontwikkeling?

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 17:

Het is helaas niet mogelijk om de vroeggeboren lammeren op te laten groeien bij een (surrogaat) moeder omdat de periode tussen geboorte en hereniging te lang is en de ooi het lam zal verstoten. Daarnaast zijn vroeggeboren lammeren zeer gevoelig voor infecties/ziekten die een ooi van nature bij zich draagt. Op basis van ervaring met lange termijnstudies in schapen door onze en andere groepen zijn wij ervan overtuigd dat moederloze opfok geen confounder is in het experiment.

Citaat bijlage III DEC advies, aanvullende vraag aan aanvrager:  
Het is duidelijk waarom te vroeggeboren lammeren niet kunnen opgroeien bij een surrogaatmoeder. Het is minder duidelijk waarom u ervoor kiest om de a terme lammeren niet ook zonder moeder te laten opgroeien, anders dan dat dit minder ongerief voor de dieren zal betekenen. Deze keuze lijkt een schonere vergelijking op te leveren, wat is daarop uw visie? U stelt dat u ervan overtuigd bent dat er geen sprake van zal zijn van een confounder effect o.b.v. eerder onderzoek. Kunt u deze stelling in de aanvraag onderbouwen met data of literatuurverwijzingen?

Citaat antwoord aanvrager bijlage III:

In de geplande studie setup vergelijken wij een 'ernstig zieke' groep (LPS-prematuriteit-ventilatie) met een 'zieke' groep (prematuriteit-ventilatie) en een gezonde controlegroep. In de laatste groep is het belangrijk een goede referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt. Hiertoe zijn spontane bevalling op à terme leeftijd en voeding via de moeder meegenomen als natuurlijke elementen om een zo'n best mogelijke start na te bootsen en daarmee een zo gezond mogelijke controlegroep te creëren. Als gunstige bijkomstigheid is er geen sprake van dieren ongerief van de à terme controlegroep. De enige confounder kan ontstaan bij een gedragstest gedragstest; de fles gevoede dieren zijn vanaf de eerste dag gewend aan mensen. Wij zijn ons hiervan bewust en zullen dit ondervangen in het trainen van de dieren. Daarnaast zullen de à terme lammeren ongeveer 2 maanden na geboorte worden gescheiden van de moeder en worden opgenomen in de kudde preterme schapen. Hier zal al een deel van het aangeleerde gedrag van de preterme schapen worden overgedragen naar de à terme lammeren. De gedragstesten zullen plaatsvinden 6 maanden plaatsvinden na samenvoegen van de kudde.

De volgende dilemma's zijn signaleerd door de DEC:

Citaat E3:

De **5.1 lid2h** had initieel veel vragen bij uitvoeringsaspecten van het project en de invloed daarvan op de waarde van de resultaten. Deze

vragen zijn door de onderzoekers uitgebreid beantwoord en hebben tot bijstelling van het voorstel geleid. Er is in de vergadering ook gesproken over of deze dierproeven bijdragen aan het verder verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen, en de wenselijkheid daarvan. De onderzoekers is gevraagd hierop te reflecteren. De onderzoekers hebben naast deze reflectie in hun antwoord ook aangegeven dat dit onderzoek niet primair gericht is op extreem te vroeg geboren kinderen maar met name op het kunnen behandelen van onvermijdelijke vroeggeboorten na 28 weken zwangerschapsduur, waarvoor een duidelijke klinische behoefte aan betere therapie bestaat.

Citaat vraag 2 DEC aan aanvrager:

Hersenaandoeningen t.g.v. vroeggeboorte (EoP) zijn deels ook een consequentie van het feit dat prematuur geboren kinderen in een steeds eerder stadium in de zwangerschap in leven kunnen worden gehouden. Uiteraard heeft dat dan gevolgen voor de ontwikkeling van (het brein van) deze kinderen. Kunt u reflecteren op de vraag of er grenzen zijn aan deze ontwikkeling en in hoeverre het door u voorgestelde dierexperimenteel onderzoek het oprekken van de grens nog verder stimuleert?

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 2:

Dierexperimenteel onderzoek heeft in de afgelopen decennia een belangrijke bijdrage geleverd in het verbeteren van de geboortezorg. Hierdoor kunnen we vroeggeboren kinderen een steeds betere kans geven op een gezond leven.

Bij de ethische vraagstukken rondom de grens van levensvatbaarheid en extreme vroeggeboorte speelt dierexperimenteel onderzoek echter een zeer beperkte rol. Anders gezegd, dierexperimenteel onderzoek is niet de drijvende kracht achter de verschuiving van de grens van levensvatbaarheid, maar eerder een antwoord daarop om deze kinderen een optimale kans te geven. Het is uiteraard wel onvermijdelijk dat de vooruitgang in perinatale zorg, die dus deels door dierexperimenteel onderzoek gestimuleerd is, gepaard gaat met een verschuiving van de grens van levensvatbaarheid.

In het kader van dit projectvoorstel is het overigens belangrijk om te realiseren dat wij ons niet zo zeer richten op extreme vroeggeboorte (< 28 weken), maar met op de veel grotere groep prematuren van 28 weken en ouder, waarvan we weten dat hun ontwikkeling - na onvermijdelijke vroeggeboorte - bedreigd is. Het is echter niet ondenkbaar dat de resultaten die geboekt worden in het voorgestelde project, geëxtrapoleerd kunnen worden naar de extreem vroeggeborenen.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
Onder C20 van uw advies noemt u dat een groot deel van de ooien gedood zal worden. De mate van ongerief dat deze dieren ondergaan zal hergebruik in de weg staan. U concludeert dat overleving van de ooien niet realistisch is. De CCD vindt deze conclusie geen recht doet aan de door de aanvrager aangedragen argumenten.

### 4 Inhoudelijke beoordeling

#### 3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	----------------------------------------------

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>		
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	Ongerief: 96,0% Matig 4,0% Licht	

### 5 Samenvatting

#### 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan geen verdoving/pijnbestrijding toe te dienen bij de pasgeboren lammeren die geïntubeerd worden voor beademing op de

intensive care unit in het kader van verfijning. De aanvrager geeft aan het dierenwelzijn te verbeteren door de dieren tijdens beademing niet te sederen (zie antwoord op vraag 31 DEC advies). **5.2 lid1**

Een deel van de pasgeboren dieren zal tijdelijk individueel gehuisvest worden op de intensive care unit en wellicht na het uitvallen van groepsgenoten.

**5.2 lid1** Het individueel huisvesten van de dieren ontbreekt in de ongeriefinschatting in de bijlage dierproeven. De aanvrager is gevraagd om het bijkomende ongerief mee te nemen in de ongeriefinschatting.

De aanvrager geeft aan de dieren die op natuurlijke wijze zullen bevallen van controledieren ter adoptie te zullen aanbieden. **5.2 lid1**

De DEC stelt als dilemma dat het onderzoek wellicht zou kunnen bijdragen aan het verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen. De onderzoeker heeft aangegeven dat het verleggen van deze grens geen onderdeel uitmaakt van het onderzoek, maar dat resultaten eventueel wel geëxtrapoleerd kunnen worden naar extreem vroeggeborenen. De DEC heeft aangegeven dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat onderzoek naar extreme vroeggeboorte geen onderdeel is van het onderhavige project.

De DEC geeft haar advies op basis van een meerderheidsstandpunt. Een DEC lid kan zich niet vinden in de onderbouwing dat het wegnemen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kan zijn voor de ontwikkeling van deze dieren. **5.2 lid1**. De aanvrager is gevraagd data aan te leveren voor dit standpunt.

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

**5.2 lid1**

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 1 april 2022 15:28  
**Aan:** 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h  
**CC:** 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215869

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 17-02-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity " met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215869. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

#### Niet technische samenvatting

In de laatste alinea onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' van uw NTS noemt u dat een gedeelte van de lammeren beademd zal worden. Kunt u in deze alinea ophelderen waarom dit gebeurt en wat het verschil is tussen de verschillende groepen vroeggeboren dieren?

Kunt u in uw NTS onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' benoemen dat een deel van de dieren zullen worden gedood?

#### Onduidelijkheden

U geeft in de bijlage dierproeven aan dat de pasgeboren lammeren individueel gehuisvest worden op de intensive care unit. Daarnaast geeft u ook aan dat er een kans is dat dieren later individueel gehuisvest kunnen worden mocht een deel van de groepsgenoten uitvallen. Kunt u het ongerief dat de dieren ondergaan tijdens de individuele huisvesting van zowel de huisvesting op de ICU als later na scheiden van groepsgenoten meenemen in de tabel ongeriefbepaling onder 'F. Classificatie van ongerief'?

In communicatie met de DEC heeft de DEC u verzocht aan te geven of het weghalen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kunnen zijn bij de ontwikkeling van de lammeren. Kunt u in uw projectvoorstel met referenties en/of eerdere data aangeven waarom dit, volgens u, niet het geval zou zijn?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

#### Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag wordt 8 april a.s. inhoudelijk besproken in de vergadering van de CCD. Als uw antwoorden uiterlijk 7 april a.s. door ons ontvangen zijn, kunnen deze worden meegenomen in de vergadering.

#### Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Geachte leden van de CCD,

Op 01-04-2022 hebben wij uw verzoek ontvangen voor aanvullende informatie voor het project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity " met aanvraagnummer AVD5.1 lid2h 202215869.

Bijgaand sturen wij ons antwoorden:

### **Niet technische samenvatting**

**In de laatste alinea onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' van uw NTS noemt u dat een gedeelte van de lammeren beademd zal worden.**

- 1. Kunt u in deze alinea ophelderen waarom dit gebeurt en wat het verschil is tussen de verschillende groepen vroeggeboren dieren?**
- 2. Kunt u in uw NTS onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' benoemen dat een deel van de dieren zullen worden gedood?**

Met uitzondering van de à terme controledieren, worden alle experimentele groepen minimaal gedurende 72 uur beademd. Dit geldt zowel voor de dieren in de korte follow-up arm (3 dagen) als de lange follow-up arm (1 jaar) van de studie. De beademing is onderdeel van de "triple hit" (LPS tijdens de zwangerschap, prematuriteit, mechanische ventilatie), die we toedienen om de klinische situatie van rondom vroeggeboorte en Encephalopathy of Prematurity na te bootsen. Bovendien is beademing bij een geboorte termijn van 132 dagen noodzakelijk voor overleving van de lammeren tijdens de eerste uren/dagen postpartum.

Wij hebben De volgende aanpassing aangebracht (onderstreept) in de tekst onder het kopje 'verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren in de NTS:

*"De schapen zullen een operatieve ingreep ondergaan die kan leiden tot wondpijn. Een infectie in het vruchtwater kan fysiek ongerief voor de foetus veroorzaken. Echter, tijdens de zwangerschap is het bewustzijnsniveau van de foetus gering, waardoor dit ongerief niet als dusdanig ervaren zal worden. De oaien zullen, evenals de mens, geen symptomen of ongerief ondervinden van een vruchtwaterinfectie. De oaien zullen een keizersnede ondergaan onder algehele narcose.*

*De lammeren worden na de vroeggeboorte verzorgd op een neonatale intensive care unit en zullen kunstmatig beademd worden. Deze kunstmatige beademing is noodzakelijk voor de overlevingskansen van de lammeren, maar speelt ook een cruciale rol bij het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen. Kunstmatige beademing kan leiden tot ongerief in de vorm van pijn en benauwdheid. Door adequate pijnstilling en ventilatie strategieën uitgevoerd door getraind personeel zal dit tot een minimum beperkt blijven.*

*Een gedeelte van de lammeren zal na beëindiging van de kunstmatige beademing worden **gedood** ten behoeve van laboratoriumanalyse van **de korte termijneffecten van de stamcelbehandeling.***

*Een tweede gedeelte van de vroeggeboren schapen zal na beëindiging van de kunstmatige beademing opgroeien tot volwassen leeftijd om de **lange termijneffecten** van de stamcel therapie te onderzoeken. Gedurende deze periode waarin de lammeren opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen*

deze lammeren onder algehele narcose een MRI-scan ondergaan van het brein. Aan het einde van de lange termijnoverleving zullen ook deze lammeren worden **gedood** ten behoeve van laboratoriumanalyses die alleen plaats kunnen vinden op postmortaal verkregen weefsels. Deze lange termijneffecten zullen worden vergeleken met een groep à terme lammeren die spontaan zijn geboren. Deze lammeren dienen referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt“

### **Onduidelijkheden**

**U geeft in de bijlage dierproeven aan dat de pasgeboren lammeren individueel gehuisvest worden op de intensive care unit. Daarnaast geeft u ook aan dat er een kans is dat dieren later individueel gehuisvest kunnen worden mocht een deel van de groepsgenoten uitvallen. Kunt u het ongerief dat de dieren ondergaan tijdens de individuele huisvesting van zowel de huisvesting op de ICU als later na scheiden van groepsgenoten meenemen in de tabel ongeriefbepaling onder 'F. Classificatie van ongerief'?**

Tijdens de huisvesting op de ICU liggen de lammeren in een hangmat op individuele bedden (radiant infant warmer). De vorm van individuele huisvesting is noodzakelijk om de volgende redenen:

1. De lammeren zijn gekoppeld aan apparatuur zoals een beademingsmachine en infuuspompen met voeding en medicatie.
2. Door de lammeren individueel te plaatsen kunnen we de lichaamstemperatuur individueel reguleren en bijsturen omdat ieder bed is voorzien van een warmtelamp. Reguleren van de lichaamstemperatuur is onder anderen essentieel voor de ademhalingsfunctie
3. Individuele plaatsing op de bedden verlaagt de kans op potentiële infecties die ontstaan door kruisbesmetting tussen lammeren.

Wij schatten het ongerief ten gevolge van deze vorm van huisvesting in als mild aangezien de lammeren nog nooit met een soortgenoot in contact zijn gekomen en dus ook geen ongerief ondervinden ten gevolge van scheiding van groepsgenoten. Het totale ongerief van individuele huisvesting op de ICU blijft hierdoor ingeschat op matig ongerief, voornamelijk veroorzaakt door de mechanische beademing op de ICU.

Wij hebben dit aangepast en grijs gearceerd in de ongerief tabel in sectie F van bijlage 1 en als volgt in sectie C van bijlage 1:

*“During ventilation on the LICU, the lambs are placed individually on a radiant infant warmer bed since:*

- *The lambs are connected to equipment such as mechanical ventilators and infusion pumps.*
- *By placing the lambs individually enables us to regulate and adjust body temperature individually because each bed is equipped with a heat lamp. Body temperature is essential for amongst others respiratory function.*
- *Individual placement on the beds reduces the risk for potential infections caused by cross-contamination between lambs“*

**In communicatie met de DEC heeft de DEC u verzocht aan te geven of het weghalen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kunnen zijn bij de ontwikkeling van de lammeren. Kunt u in uw projectvoorstel met referenties en/of eerdere data aangeven waarom dit, volgens u, niet het geval zou zijn?**

Middels de gekozen strategie creëren we 3 groepen:

1. Een ernstig zieke groep verkregen door de combinatie *in utero* LPS-blootstelling, prematuriteit en mechanische ventilatie.
2. Een gematigd zieke groep verkregen door prematuriteit en mechanische ventilatie.
3. De best mogelijke controlegroep, zijnde à term geboren dieren

Het verschil in postnatale zorg tussen de "natuurlijke" à terme controledieren (natuurlijke geboorte, moedermelk, hechting) en de experimentele groepen (keizersnede, flesvoeding, separatie) zou een confounder kunnen zijn bij de ontwikkeling van de lammeren. Wij hebben echter om twee redenen bewust gekozen voor "natuurlijke" a terme controledieren.

Ten eerste, laten onze preliminaire data en observaties uit eerdere protocollen zien dat het fenotype van ons model (multiple hit; LPS tijdens de zwangerschap, vroeggeboorte en mechanische ventilatie) zich ruim onderscheidt ten opzichte van de controle situatie, die een gematigd fenotype lieten zien. Dieren die zijn blootgesteld aan de multiple-hit zijn namelijk ten tijde van de ICU-fase én in de daaropvolgende follow-up na weaning duidelijk slechter wat betreft cardiorespiratoire conditie en (motorisch) gedrag in vergelijking de gematigd zieke groep. De gematigd zieke groep scoort voor deze parameters weer duidelijk slechter dan de gezonde à terme controledieren. Uit dit waargenomen verschil tussen de 3 groepen mogen we concluderen dat onze experimentele protocollen een robuust fenotype creëren waarbij separatie en flesvoeding hooguit een marginaal effect zal hebben op ons fenotype en dat opgroeien van de à term geboren lammeren bij de moeder dus geen belangrijke confounder zal zijn.

Ten tweede, we hebben behoefte aan de meest optimale situatie als controle. Het volledig uitsluiten van confounding door postnatale zorg zou betekenen dat we nog een extra "experimentele" controlegroep (keizersnede, flesvoeding, separatie) zouden moeten toevoegen. Gelet op het duidelijke verschil in fenotype tussen de groepen zoals hierboven toegelicht, zou een dergelijke extra groep noch conform het principe van verfijning noch vermindering zijn.

Wij hebben de argumentatie voor de methodologie rondom à term geboren controledieren als volgt toegelicht en grijs gearceerd in sectie 3.4.2 van het projectvoorstel:

*"With the chosen strategy, we will have 3 experimental groups all with a distinct phenotype being:*

1. *A severe phenotype caused by the combination of in utero LPS exposure, preterm birth and mechanical ventilation.*
2. *A mild phenotype caused by prematurity and mechanical ventilation*
3. *The most optimal reference group, being lambs born at term*

*We will compare all preterm born lambs with a term born control group. These animals will serve as a baseline group and represent the most natural and optimal start of life, comprising spontaneous delivery at term and rearing by the mother, including feeding with breastmilk).*

*Rearing of the lambs by the ewe could be a confounder. However, we have deliberately chosen to let the lambs stay with the ewe for the following reasons:*

- 1. Preliminary data and observations from a study by our group, in which the same multiple-hit model is used, resulted in a distinct phenotype; LPS-exposed lambs had worse cardiovascular and motor outcomes on the ICU and during the longitudinal follow-up thereafter when compared to preterm non-exposed animals which displayed a milder phenotype. Importantly, animals with the mild phenotype had worse outcomes when compared to term born references. Based on these observations, we consider that the contribution of motherless rearing of preterm born lambs to these robust phenotypes is marginal. As such, we do not expect significant differences in the chosen outcome measures due to postnatal care.*
- 2. To completely exclude potential confounding by postnatal care, we would need to add an additional "experimental" group that is born at term via Caesarean section, separated from the ewe and hand-reared including bottle feeding. Adding this group to the experiment would require additional animals and increased discomfort which is not justified considering our earlier findings."*

Als er verder aanvullend informatie nodig zou zijn, verneem ik dit graag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de *Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning* op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity

## 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Preterm birth, stated as birth at a gestational age under 37 weeks, is the most important cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries. Of all children born in the Netherlands, more than 7% are preterm. Advances in perinatal medicine, including improvements in respiratory support, resulted in the fact that even the sickest and smallest babies nowadays often survive. However, surviving preterm infants are at increased risk for life-long neurological disorders, collectively termed Encephalopathy of Prematurity (EoP), for which currently **no therapy** is available.

Over the past decade, many epidemiological and preclinical studies of preterm born infants and EoP have identified two antenatal (prenatal) factors that are almost always linked with the severity of EoP: exposure to infection/inflammation (chorioamnionitis) or hypoxia-ischemia (HI) [1-4]. The current proposal will specifically focus on antenatal infection/inflammation as etiological factor for preterm brain injury.

### **Antenatal infection/inflammation**

Chorioamnionitis (i.e. antenatal infection/inflammation) is defined as inflammation of the fetal membranes (chorion and amnion). When the fetus is directly exposed to intrauterine inflammation/infection via direct skin contact or swallowing and breathing movements in utero, the fetal immune system responds with release of pro-inflammatory cytokines that induce a fetal inflammatory response syndrome (FIRS).

Preterm neonates born with FIRS show a higher prevalence of prematurity-associated complications such as, respiratory distress syndrome, sepsis, bronchopulmonary dysplasia, periventricular leukomalacia (PVL), cerebral palsy (CP) and death [5]. Of these, brain injury (PVL, CP) is the biggest contributor to mortality and morbidity in these preterm infants [6, 7]. In fact, preterm infants exposed to FIRS have a risk of developing CP or PVL, that is 1.5 - 3-fold higher compared with unexposed preterm infants [8].

Although chorioamnionitis is an independent risk factor for preterm brain injury [9], in the vast majority of preterm infants, brain injury is caused by accumulation of **multiple perinatal and postnatal inflammatory triggers** comprising antenatal inflammation (i.e. chorioamnionitis) and postnatal injurious triggers such as mechanical ventilation. Whilst this respiratory assistance is essential for survival, ventilation increases the risk and incidence of brain injury [10]. These perinatal and postnatal inflammatory triggers cause a self-perpetuating cycle of peripheral and cerebral inflammation, primarily mediated by activation of microglia, the resident innate immune cells (i.e. macrophages) of the brain. Under physiological circumstances microglia play a central role in synaptic transmission and myelin maintenance. However, upon activation, microglia switch from a trophic/regenerative state to a pro-inflammatory phenotype mediating death and/or maturation blockade of oligodendrocytes. Loss of oligodendrocytes causes myelination defects and subsequent changes in cortical microstructure and connectivity leading to EoP [1, 11-14].

### **Therapy**

Following birth, all preterm infants receive supportive care, including adequate respiratory support, blood pressure support, normalization of fluid-electrolyte balance, and blood glucose levels, and, if necessary, antibiotic treatment, and treatment of seizures. Preterm brain injury evolves over time in a period of hours to weeks, creating a window of opportunity for treatment. However, therapeutic options to improve the outcomes of preterm neonates suffering from brain injury are lacking [1, 15].

Given the dominant role of inflammation in the induction of preterm brain injury, we consider that immunomodulatory interventions have a high potential to support recovery from brain injury in vulnerable neonates. Within this context, we and others have successfully tested the therapeutic effects of immunomodulatory interventions such as interleukin (IL)-2 [16, 17], IL-1 receptor antagonist [18] and pharmacological nutrition with plant sterols [19] on organ injury following fetal exposure to *in utero* inflammation. Moreover, studies have demonstrated the neuroprotective potential of cytokine antagonism or inhibition in the course of antenatal inflammation and hypoxia-ischemia [20, 21]. Immune modulation can be directly effective or indirectly by improving the efficacy of other therapies.

### **Stem cells**

Cell-based interventions as a therapeutic strategy for injury to the (neonatal) central nervous system have gathered much attention in the past decade [22-30]. Many different types of stem cells, derived from fetal,



placental, and adult tissues are currently under investigation [31-36]. Stromal cells, including mesenchymal stem cells (MSCs), have been a particular focus of research as they are easily obtainable (i.e. from cord blood, Wharton's jelly, bone marrow) and do not have the ethical and safety concerns of embryonic stem cells [27, 30]. Moreover, they lack of expression of MHC class II antigens, allowing their use for allogenic therapy [30]. In addition, the efficacy and safety of human SCs (xenotransplantation) has been demonstrated by our and other groups [12, 13, 37-39]. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) has mainly been attributed to their immune-modulatory and regenerative potential [27, 28, 33, 40]. The effects of MSC on the immune system comprise both modulation of innate and adaptive immune responses from a pro-inflammatory status towards an anti-inflammatory status, thereby reducing tissue injury and creating an environment in favor of tissue repair and regeneration [33, 34, 41].

Besides immune modulation in favor of regeneration, MSCs directly affect the injured central nervous system through secretion of neurotrophic factors that stimulate and maintain neurogenesis of the endogenous neuronal stem cell population and its subsequent differentiation into neuronal and oligodendroglial lineages [28, 33, 40, 42-44].

The neuroprotective potential of systemic stromal cell therapy was shown by our group in a preclinical preterm ovine model of global hypoxia-ischemia-induced injury [45-48]. MSC administration during the latent phase following global HI resulted in functional improvement and prevented hypomyelination of the subcortical white matter at 7 days post HI. These protective effects were attributed to anti-inflammatory effects since neuroinflammation and peripheral immune activation were significantly reduced [45, 46]. Specifically, intravenous MSC treatment reduced the proliferative capacity of splenic T lymphocytes with concomitant reduced cerebral T cell infiltration. In addition, systemic stromal cell therapy ameliorated splenic involution caused by global HI, implicating a key role of the spleen in the protective mechanisms of stem cell therapy.

There is increasing evidence for the effectiveness of stem cell administration via the intranasal route (IN) route, which is a feasible route for pharmacological treatment of neonates. This concept of IN administration is based on passage of stem cells over the cribiform plate along the olfactory nerve allowing for rapid dispersion throughout the brain, where local effects can be exerted [49-54]. In a study by van Velthoven et al. delayed (10 days post HI injury) IN administration of MSC therapy improved neurological outcomes 28 days post HI. These improved outcomes following IN administration were attributed to the regenerative potential of MSCs rather than inhibition of injurious (e.g. inflammatory) processes or prevention of injury since cells were administered when injury was readily established [53]. In fetal sheep, delayed intravenous stem cell administration 5 days after global HI was less effective than acute (early) administration 12 hours after reperfusion [55]. Efficacy of early MSC administration was attributed to systemic and neuro-immunomodulatory effects [55].

Although the pathophysiology leading to brain injury in preterm infants between HI and antenatal infection/inflammation show substantial overlap in terms of a systemic immune response towards the brain, there are discrepancies, mostly in temporal evolution/timing of injury, that inhibit translation of findings in HI models to the situation of antenatal infection/inflammation (chorioamnionitis). The critical role of timing was recently confirmed and explored in an LPS kinetics study by our group. In this study, we found that intra-amniotic exposure to LPS induced systemic within 12 h after LPS exposure, followed by neuroinflammatory response at 48 hours post LPS exposure. Interestingly, white matter injury in following antenatal LPS exposure was not detected until 15 days post-LPS exposure [46], whereas white matter injury following global HI was readily visible at 7 days post HI [11, 12, 38]

Collectively, administration route in relation to timing of administration appears to be crucial for the action of MSCs (immune modulation and regeneration) to establish optimal neuroprotection. As such, repeated dosing by different administration routes throughout different phases disease progression might ultimately lead to the greatest benefit.

In the current project we will test the therapeutic effect of early intravenous (IV), and combined early IV and delayed IN administration in a translational ovine model of perinatal inflammatory stress-induced EoP

## References:

1. Ophelders, D.R.M.G., *et al.*, *Cells*, 2020. **9**(8): p. 1871.
2. Lev ton, A., *et al.*, *Early human development*, 2016. **93**: p. 25-32.

3. Volpe, J.J., *Semin Pediatr Neurol*, 2009. **16**(4): p. 167-78.
4. Volpe, J.J.J.T.L.N., 2009. **8**(1): p. 110-124.
5. Wolfsberger, C.H., *et al.*, *Frontiers in pediatrics*, 2020. **8**: p. 401.
6. Goldenberg, R.L., *et al.*, *The Lancet*, 2008. **371**(9606): p. 75-84.
7. Tronnes, H., *et al.*, *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2014. **56**(8): p. 779-85.
8. Reiss, J.D., *et al.*, *Experimental Neurology*, 2022: p. 113988.
9. Gotsch, F., *et al.*, *Clinical obstetrics and gynecology*, 2007. **50**(3): p. 652-683.
10. Barton, S.K., *et al.*, *Neonatology*, 2016. **110**(2): p. 155-162.
11. Hagberg, H., *et al.*, *Nature Reviews Neurology*, 2015. **11**(4): p. 192-208.
12. Jellema, R.K., *et al.*, *PLoS one*, 2013. **8**(8): p. e73031.
13. Jellema, R.K., *et al.*, *Journal of neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 241.
14. Ophelders, D.R., *et al.*, *Journal of neuroinflammation*, 2016. **13**(1): p. 29.
15. Van Bel, F., *et al.*, *Frontiers in physiology*, 2019. **10**: p. 181.
16. Nikiforou, M., *et al.*, *Inflammatory bowel diseases*, 2015. **21**(9): p. 2026-2038.
17. Willems, M.G., *et al.*, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2015. **310**(1): p. L1-L7.
18. Wolfs, T.G., *et al.*, *Mucosal immunology*, 2013. **6**(3): p. 547-556.
19. van Gorp, C., *et al.*, *Nutrients*, 2019. **11**(5): p. 968.
20. Galinsky, R., *et al.*, *Journal of Neuroinflammation*, 2020. **17**(1): p. 1-16.
21. Disdier, C., *et al.*, *Brain sciences*, 2018. **8**(6): p. 101.
22. Bennet, L., *et al.*, *Annals of neurology*, 2012. **71**(5): p. 589-600.
23. Tomanlio, L., *et al.*, *Annals of neurology*, 2011. **70**(5): p. 698-712.
24. van Velthoven, C.T., *et al.*, *Brain research reviews*, 2009. **61**(1): p. 1-13.
25. Gortner, L., *et al.*, *Klinische Pädiatrie*, 2012. **224**(4): p. 233.
26. Borlongan, C.V., *et al.*, *Pediatric research*, 2011. **70**(1): p. 3-9.
27. Donega, V., *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2013. **33**(5): p. 625-634.
28. van Velthoven, C.T., *et al.*, *Pediatric research*, 2012. **71**(4-2): p. 474-481.
29. Dalous, J., *et al.*, *Stem cells and development*, 2012. **22**(1): p. 169-179.
30. Fleiss, B., *et al.*, *Clinics in perinatology*, 2014. **41**(1): p. 133-148.
31. Jiang, Y., *et al.*, *Nature*, 2002. **418**(6893): p. 41-49.
32. Méndez-Ferrer, S., *et al.*, *nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
33. Uccelli, A., *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(9): p. 726-736.
34. Le Blanc, K., *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2012. **12**(5): p. 383-396.
35. Bieback, K., *et al.*, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008. **35**(4): p. 286-294.
36. Portmann-Lanz, C.B., *et al.*, *American journal of obstetrics and gynecology*, 2006. **194**(3): p. 664-673.
37. McDonald, C.A., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(10): p. 2449.
38. Tanaka, E., *et al.*, *Frontiers in neurology*, 2018. **9**: p. 133.
39. Gussenhoven, R., *et al.*, *Stem cells translational medicine*, 2020.
40. Uccelli, A., *et al.*, *Best practice & research Clinical haematology*, 2011. **24**(1): p. 59-64.
41. Siegel, G., *et al.*, *Transplantation*, 2009. **87**(9S): p. S45-S49.
42. van Velthoven, C.T., *et al.*, *The Journal of Neuroscience*, 2010. **30**(28): p. 9603-9611.
43. Rivera, F.J., *et al.*, *Stem Cells*, 2006. **24**(10): p. 2209-2219.
44. Steffenhagen, C., *et al.*, *Stem cells and development*, 2011. **21**(11): p. 1838-1851.
45. Jellema, R.K., *et al.*, *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e73031.
46. Jellema, R.K., *et al.*, *Journal of neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 1-14.
47. Gussenhoven, R., *et al.*, *Stem cells translational medicine*, 2021. **10**(1): p. 57-67.
48. Ophelders, D.R., *et al.*, 2016. **5**(6): p. 754-763.
49. Donega, V., *et al.*, *Experimental neurology*, 2014. **261**: p. 53-64.
50. Donega, V., *et al.*, *PLoS one*, 2013. **8**(1).
51. Wagenaar, N., *et al.*, *Dev Med Child Neurol*, 2017. **59**(10): p. 997-1003.
52. van den Heuvel, L.G., *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2019. **39**(2): p. 223-239.
53. Van Velthoven, C.T., *et al.*, *Pediatric research*, 2010. **68**(5): p. 419-422.
54. Oppliger, B., *et al.*, *Stem cells and development*, 2016. **25**(16): p. 1234-1242.
55. Li, J., *et al.*, *Experimental neurology*, 2016. **283**: p. 179-187.
56. Blencowe, H., *et al.*, *Reprod Health*, 2013. **10 Suppl 1**: p. S2.
57. Cannavò, L., *et al.*, *Italian Journal of Pediatrics*, 2020. **46**(1): p. 1-5.
58. Boswinkel, V., *et al.*, *European Journal of Radiology*, 2021. **136**: p. 109500.
59. Vaes, J.E., *et al.*, *Glia*, 2021. **69**(3): p. 655-680.

## 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

The main goal of this project is to validate the neuroprotective potential of two SC-treatment paradigms, being early intravenous (IV) and delayed intranasal (IN) *in vivo* a preclinical ovine model of EoP caused by perinatal inflammatory stress, comprising antenatal infection/inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation.

For this purpose, we have the following research objectives:

The specific objectives are:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess the long-term neuroprotective potential of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

#### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

The proposed objectives are achievable as we use well-established models that are currently still in use. The laboratory of Pediatrics of [5.1 lid2h](#) has a lot of experience with ventilated preterm lambs has set up a unique infrastructure in which we successfully perform long-term survival studies in preterm lambs.

Moreover, the laboratory of Pediatrics has extensive experience with stem cell applications in ovine models [12, 13, 47, 48]. Moreover, the infrastructure and protocols necessary for such stem cell trials are readily available.

#### 3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

### 3.3 Belang

#### 3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Worldwide, 15 million babies are born preterm every year, of which 400.000 are born in the EU and 12.000 in the Netherlands [56]. In 2010, the Global Burden of Disease Study estimated that preterm birth was the commonest cause of death and disability in children under the age of 5 years. We are fortunate that most of these infants survive, but morbidity is very high, predominantly due to neurological damage. Compared to infants born at term, preterm babies have an increased risk of acute and chronic brain injuries such as cognitive deficits and behavioral (40–50%) and cerebral palsy (5–10%) [57]. Currently, treatments to repair the brain damage of EoP are limited [1, 15].

The severity of this neurological injury is highlighted by the fact that in a high healthcare setting more than 50% of babies born before 28 weeks ('extreme preterm') and about 30% of babies born between 28 and 32 weeks ('very preterm') will suffer lifelong disability, including cerebral palsy (CP), severely impaired cognitive functions, and psychiatric disorders such as attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorders (ASD). Even those babies born between 32 and 37 weeks (i.e., 'moderate to late preterm') which accounts for 80% of all preterm births are at increased risk of neonatal mortality and morbidity, including increased rates of CP and lower cognitive performance on standardized IQ exams [58]. As such, prematurity is a significant problem for the provision of long-term educational and health care.

This project aims to validate SCs as a regenerative therapy for EoP to improve the quality of life for these infants and reduce the societal costs of their special needs.

In addition, assessment of bio-distribution in relation to efficacy and cell fate will provide novel and essential mechanistic insight, which will contribute to improve existing treatment paradigms, identify novel therapeutic targets and provide essential data on safety of cell-administration.

#### 3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

This project has several stakeholders:

- In this project we will use animals to investigate the proposed research questions. The animals will undergo procedures that will cause discomfort. As such, this makes them an important stakeholder in this project. With the available expertise of our research group and novel insight that are gained during this project, we will limit the degree of discomfort. Reduction of discomfort is in the best interest of the animal and will also lead to reliable data.
- Future infants with EoP and their families, caregivers will benefit from this project. EoP is still an unmet clinical need. The results from this project will form the scientific basis for follow-up studies and (ultimately) well-designed clinical trials in which infants will be enrolled. This project now focuses on neonates born moderate/late preterm, but results have the potential to be extrapolated to infants born at earlier stages of pregnancy.
- Other researchers, such as developmental neuroscientists, stem cell biologists, molecular biologists, immunologists, bioinformaticians, and engineering scientists are involved in data acquisition and interpretation. They will present data in peer-reviewed papers, theses, and conferences.
- Specialists from the following clinical departments are involved in this study through active input, optimization and execution of specific assessments and data processing: Pediatrics/neonatology, child neurology, pediatric radiology and clinical physics, movement sciences, orthopedics, pediatric nephrology, clinical immunology. Active participation of clinical partners is essential for clinical translation of our findings.
- Pharmaceutical partner. The SCs will be provided by a pharmaceutical partner. They are not involved in the actual animal experiments and are not involved in data interpretation or publication of results. However, they benefit from our results and insights as these will aid in further development of the cell product, not only for the clinical indication of EoP, but also others.

### **3.4 Strategie**

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

This project is part of a H2020 consortium that aims to validate umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells (H-MSCs) as a regenerative therapy for preterm brain injury, which will form the basis of well-designed clinical trials.

#### ***Preparatory studies:***

Based on input generated in small animal models by consortium partners on the regenerative abilities of various doses with respect to timing and route of administration of SCs, we will test the most 'promising' dose in our preclinical ovine model of preterm brain injury. Establishment of the most promising dose will be a milestone and will serve as a GO-moment to start with the ovine studies. In previous studies, we already showed that SCs of various sources have therapeutic efficacy without adverse reactions, thereby demonstrating compatibility of SCs in our model(s).

The sheep model closely resembles the human developmental biology in terms of similar fetal and neonatal development of the brain, other organs and the immune system. Moreover, the size of the animal allows fetal instrumentation, inducing antenatal inflammation and neonatal care according to clinical standards. In line with these strong assets, the sheep model has an impressive track record of clinical translation of important therapeutic interventions in neonatal medicine (e.g., therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, maternal corticosteroids for fetal lung maturation and surfactant replacement therapy for respiratory distress syndrome) and basic understanding of fetal and neonatal

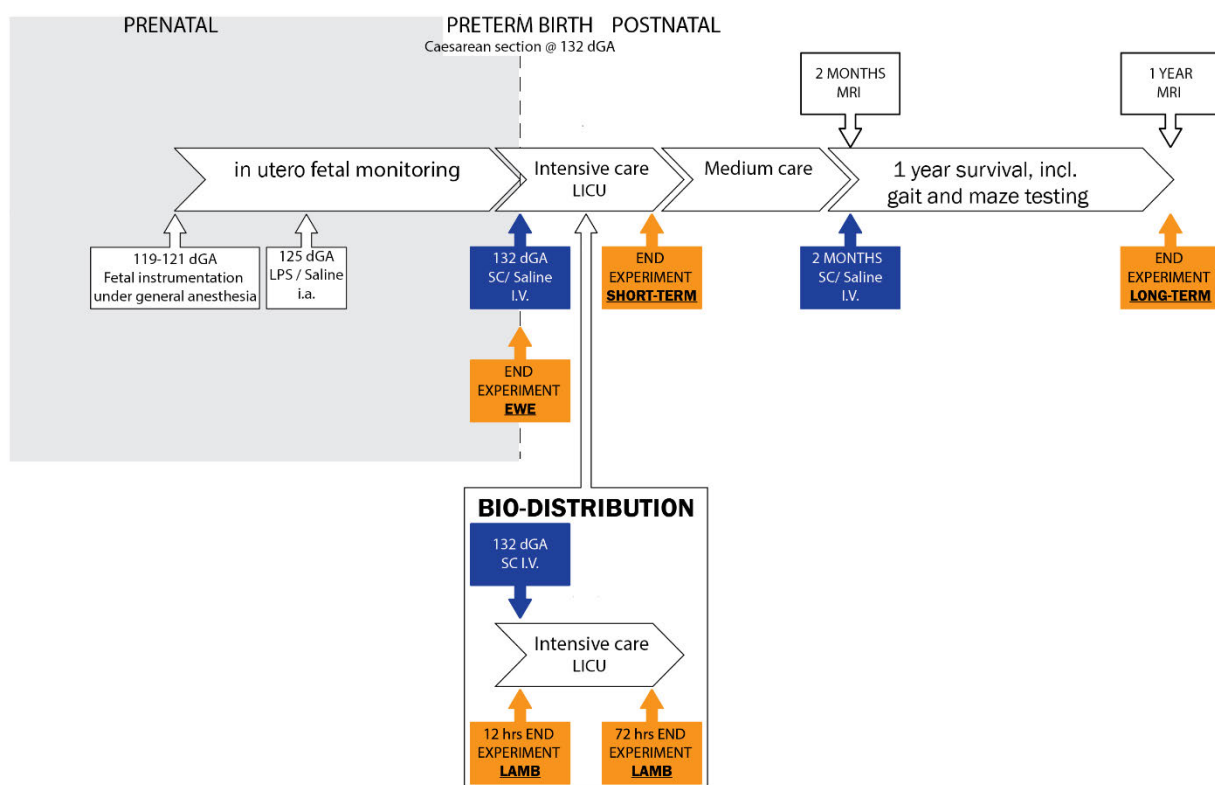
physiology. Therefore, this is one of the most suitable animal models to validate new therapeutic strategies in neonatal medicine.

### **Ovine studies:**

For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. We will use this model since brain injury in the vast majority of neonates is caused by accumulation of multiple perinatal and postnatal inflammatory triggers.

For assessment of short-term efficacy, lambs will be euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment (figure 1).

Depending on the experimental group, lambs will receive postnatal SCs via the intranasal route.



**Figure 1 Experimental design.** For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72hours. Stem cells will be administered at 4 hours after preterm birth (intravenous (IV)) and/or intranasal (IN) at 2 months. For assessment of short-term efficacy, lambs are humanely euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment. For bio-distribution will be studied at 12 hours and 72 hours after IV administration.

We will investigate short- and long-term therapeutic efficacy of treatment paradigms based on input generated from a matrix performed in rodents performed by PREMSTEM-consortium partners. In addition,

we will investigate short-and long-term bio-distribution and cell fate of the pre-defined treatment paradigms.

A major milestone we already accomplished for this project is that the models we use (both long - and short-term) are successfully up and running. Moreover, from the rodent studies performed by our consortium partners, it became evident that that delayed intranasal SC administration at 2 months postnatal in particular neuro-protective effect. In addition, the preliminary work done by our laboratory and that of colleagues has shown that intravenous administration of SCs within 24-48 hours after preterm birth has a protective effect on the brain and other organ systems, including the lung. Based on these data, will only test the short-term effects of an "early" intravenous and the long-term effects of a combined "early" intravenous and "delayed" intranasal SC administration.

We will explore the protective potential of SCs on the structural and functional outcome of the preterm brain in our ovine model. Since development of EoP finds its origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation), that cause a self-perpetuating cycle of systemic and cerebral inflammation, we will administer SCs intravenous (IV) immediately after preterm birth. With the IV dose, we want to investigate (in the circulation) the effects of perinatal stress on neurodevelopmental and immunological outcome during the transition from fetus into childhood till adulthood.

Perinatal stress is associated with direct neurodevelopmental injuries (such as seizures), with potential life-long consequences, such as cognitive and movement impairments. Consequently, such latter consequences can only be proven at in later life (1 year in sheep). Therefore, the therapeutic effects will be studied during early postnatal life (**objective 1**) and at adulthood in comparison to term born reference lambs to correct for possible long-term effects of preterm birth alone (**objective 2**). Moreover, short-term assessment will provide essential mechanistic insights in to further clarify the working mechanism of the IV administered stem cells.

Although early targeting of inflammatory processes leading to EoP with IV administration might be an effective strategy, it remains to be clarified that this therapeutic effect is permanent or that a proportion of neonates might still develop a form of structural brain injury with life-long functional consequences. In these infants, a second dose of IN stem cells, at 2 months when structural injury is clinically evident, will potentially boost endogenous regeneration and prevent or diminish further functional disability in later life. However, the neuroprotective effects of IN stem cell therapy can only be assess in a long-term cohort.

In this project we will start with **objectives 1 and 3**, being short-term neuroprotective potential of IV administered SCs and cell tracing, followed by longitudinally assessment of the long-term neuroprotective potential SC delivery (**objective 2**).

We will longitudinally assess our read-outs between experimental groups, including a term born control group at 8 and 12 months. After assessment at 12 months, the end of experiment in the long-term study is reached. We have chosen to assess functional neurodevelopment (gait and maze) at 8 months as training of the animals for these purposes requires a substantial amount of time and it is not yet well-defined when training is completed. Gait analysis is measured in our lambs since children born with EoP show aberrant motor function including aberrant walking patterns.

We have previously successfully performed gait analysis on lambs from 8 months onwards, which is a **milestone** for the proposed experiments. We will start training for gait analysis and maze testing at an early age. If successful training, defined as the ability to calmly walk on a leash and to calmly walk on a treadmill, is accomplished earlier than at the proposed 8 months, we will perform this assessment at a younger age. Successful training will, therefore, serve as a **GO** moment for gait analysis.

With maze testing we will assess cognitive and memory abilities which are also often affected by EoP. We are currently in the process of setting up the maze testing for sheep in preterm born sheep exposed to perinatal inflammatory stress. As such, successful implementation of maze testing in healthy controls is a **milestone** and will serve as a **GO** moment to further implement this technique with lambs born in the current project.

Cell tracing (**objective 3**) will be studied at 12 hours and at 72 hours. We will assess bio-distribution at 12 hours since the administered cells are still viable at this time point and we can assess the location where these cells have migrated to and will exert their function. Assessment of bio-distribution at 72 hours post

administration will provide mechanistic insight in the stem cell fate and on the interaction between the stem cells and their micro-environment (e.g. other cells).

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

##### **Short- and long-term survival:**

Development of EoP seems to originate in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of SCs in the context of these factors. Importantly, neurodevelopmental complications can emerge at different stages throughout life, including during adolescence or young-adulthood. Consequently, we aim to investigate the effects of SC therapy in early life and at adulthood and in comparison to term born control animals. We will start with the short-term and cell tracing experiments followed by long-term survival studies. Short-term and tracing studies will be done simultaneously as some of the animals are labeled for both studies and all experimental procedures are identical.

In the proposed study, we will investigate both short- and long term effects of SC treatment through assessment and correlation of functional, histological and cellular parameters. These data will provide essential mechanistic insights into the development of brain pathologies after preterm birth/perinatal inflammatory stress and the effects of the therapy and are, in part, performed with tissues and cells acquired postmortem. Within this context, long-term studies are not dependent on the results of the short-term studies since effects of perinatal inflammatory stress with and without SC treatment often become visible at later stages in life, whereas cellular/molecular changes that serve as the basis for these effects might be (transiently) present at an early stage.

##### **Term born controls:**

With the chosen strategy, we will have 3 experimental groups all with a distinct phenotype being:

1. A severe phenotype caused by the combination of in utero LPS exposure, preterm birth and mechanical ventilation.
2. A mild phenotype caused by prematurity and mechanical ventilation
3. The most optimal reference group, being lambs born at term

We will compare all preterm born lambs with a term born control group. These animals will serve as a baseline group and represent the most natural and optimal start of life, comprising spontaneous delivery at term and rearing by the mother, including feeding with breastmilk).

Rearing of the lambs by the ewe could be a confounder. However, we have deliberately chosen to let the lambs stay with the ewe for the following reasons:

1. Preliminary data and observations from a study by our group, in which the same multiple-hit model is used, resulted in a distinct phenotype; LPS-exposed lambs had worse cardiovascular and motor outcomes on the ICU and during the longitudinal follow-up thereafter when compared to preterm non-exposed animals which displayed a milder phenotype. Importantly, animals with the mild phenotype had worse outcomes when compared to term born references. Based on these observations, we consider that the contribution of motherless rearing of preterm born lambs to these robust phenotypes is marginal. As such, we do not expect significant differences in the chosen outcome measures due to postnatal care.
2. To completely exclude potential confounding by postnatal care, we would need to add an additional "experimental" group that is born at term via Caesarean section, separated from the ewe and hand-reared including bottle feeding. Adding this group to the experiment would require additional animals and increased discomfort which is not justified considering our earlier findings.

##### **Cell tracing:**

Cell tracing (**objective 3**) will be studied at 12 hours and at 72 hours following IV administration. We will assess bio-distribution at 12 hours since the administered cells are still viable at this time point and we can assess the location where these cells have migrated to and will exert their function. Assessment of bio-

distribution at 72 hours post administration will provide mechanistic insight in the stem cell fate and on the interaction between the stem cells and their micro-environment (e.g. other cells).

Cell tracing will only be performed on the IV administered SCs since IN administration is performed at 2 months post preterm birth and molecular outcomes are assessed at 1 year. Due to the size of the animal (>40kg at 1 year), the discriminative power of our laboratory technique is too little to reliably detect cells. In addition, in a study by Vaes et al., conducted in a rodent model of EoP, stem cells labeled with multimodal nanoprobe actively migrated to injured brain regions after intranasal administration to exert their function. Migration of stem cells was driven by release of chemo-attractants by injured brain tissue [59].

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Perinatal inflammation with postnatal survival
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- | 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in. | Volgnummva | Titel dierproef                                |
|---------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------|
|                                                         | 1          | Perinatal inflammation with postnatal survival |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

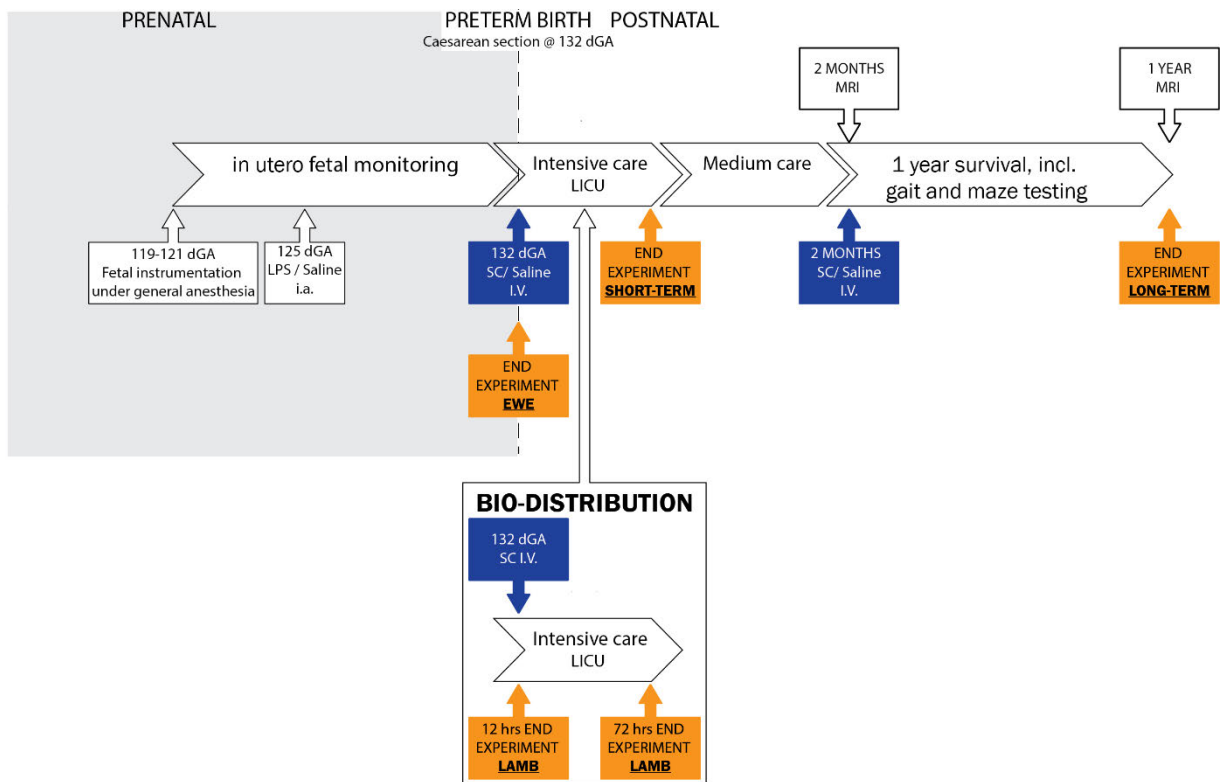
The main goal of this project is to validate the neuroprotective potential of two SC-treatment paradigms, being early intravenous (IV) at and delayed intranasal (IN) *in vivo* in a preclinical ovine model of EoP caused by perinatal inflammatory stress, comprising antenatal infection/inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation.

For this purpose, we have the following research objectives:

The specific objectives are:

1. To assess the short-term neuroprotective potential of IV administered SCs in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation)
2. To longitudinally assess the long-term neuroprotective potential of combined 'early' IV and 'delayed' IN SC treatment in the course of perinatal inflammatory stress (i.e. antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation).
3. To perform cell tracing of the administered SCs.

We will investigate these objectives in a translational ovine model of perinatal inflammatory stress, comprising antenatal inflammation, and postnatal mechanical ventilation (figure 1).



**Figure 1 Experimental design.** For this project, preterm fetuses will be surgically instrumented at 120 or 121 dGA. At 125 dGA the fetuses will be exposed to perinatal inflammatory stress comprising intra-amniotic (antenatal) lipopolysaccharide (LPS), followed by preterm birth (C-section) at 132 dGA, and postnatal intensive neonatal care including mechanical ventilation for max. 72 hours. Stem cells will be administered at 4 hours after preterm birth (intravenous (IV)) and/or intranasal (IN) at 2 months. For assessment of short-term efficacy, lambs are humanely euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilator support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment. For bio-distribution will be studied at 12 hours and 72 hours after IV administration.

For assessment of short-term efficacy, lambs will be euthanized 72 hours after preterm birth. For long-term studies, lambs will be weaned off ventilation support and hand reared towards adulthood (1 year). During long-term survival, lambs will undergo MR imaging under general anesthesia, monthly blood sampling for assessment of immune status and gait analysis and maze testing for functional/behavioral assessment.

For cell tracing experiments lambs will be euthanized 12 hours and 72 hours after SCs administration.

### Neurodevelopmental outcomes:

#### Short-term:

Functional/behavioral: amplitude-integrated (a)EEG, MRI, Sleep-wake cycles, ultrafast Doppler ultrasound

Structural: histology (white matter injury and neuroinflammation), MRI, ultrasound

Molecular: microglia, astrocytes, CSF

#### Long-term:

Functional/behavioral: aEEG, MRI, Sleep-wake cycles, ultrafast Doppler ultrasound, gait analysis, maze testing

Structural: histology (white matter injury and neuroinflammation), MRI, ultrasound

Molecular: microglia, astrocytes, CSF

Our **primary neurodevelopmental outcome** parameters are neuroinflammation and white matter injury. Besides assessment of neurodevelopment, we will also assess pulmonary development/function, renal development/function, cardiovascular development/function, intestinal development/function.

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

### **Fetal instrumentation and antenatal inflammation**

For this project, pregnant ewes with singleton fetuses (119-121 dGA, term is ~147 days) will undergo fetal instrumentation under general anesthesia. Previous experiments in the Pediatrics lab have proven feasibility and reliability of this operation method with minimal fetal or maternal losses [1]. During instrumentation fetuses are exposed via a maternal laparotomy and hysterotomy. After exposure, the fetuses are equipped with arterial and venous catheters and a catheter in the amniotic cavity. Following placement of the catheters, the uterus and maternal abdomen are closed and all catheters are exteriorized via a trocar hole in the maternal flank. These catheters enable fetal monitoring (blood gas), blood sampling to assess their inflammatory status and the amniotic line allows for administration of lipopolysaccharide (LPS).

For the long-term studies, no vascular catheters will be placed as these impair postnatal survival since they need to be surgically removed and there is a risk of hind leg ischemia/hypoperfusion due to obstruction of arterial perfusion.

After a recovery period, fetuses will be exposed to antenatal inflammation induced by intra-amniotic (antenatal) LPS exposure at 125 dGA.

### **Postnatal survival and neonatal care**

Seven days after induction of antenatal inflammation, the lambs are born preterm via Caesarean section, intubated, and transferred to the Lamb Intensive Care Unit (LICU) where they receive intensive neonatal care including mechanical ventilation. Immediately after preterm birth, the ewe is euthanized while under general anesthesia. The maturational age was chosen due to relative lung and brain immaturity, sensitivity to perinatal inflammatory stress including antenatal LPS exposure and ventilator injury.

In case of the long-term animals, vascular catheters will be placed during Caesarean section in the umbilical vessels or hind leg (modified EXIT-procedure). Surfactant replacement therapy will be started immediately to maintain proper gas exchange and continued until the fetus/lamb does not depend on exogenous surfactant to maintain sufficient gas exchange. Parenteral feeding will start immediately after birth according to clinical guidelines and will be supplemented with enteral feeding of colostrum within 6 hours after birth. Vital parameters, incl. blood pressure, oxygen saturation, temperature, ECG and EEG are monitored continuously with subdermal needle electrodes that are also used in preterm infants in the clinic. These needle electrodes are placed shortly after Caesarean section, before the lamb is awake and will remain in situ for continuous measurements during the 72 hour ventilation period. The electrodes are connected by cables to a measuring system. The freedom of movement of the lambs in the hammock is not impeded by the cables.

Ventilation parameters (FiO<sub>2</sub> and frequency) are continuously adjusted based on arterial blood gas analysis and pulse oximetry. After 72 hours, the short-term animals are euthanized and organs and tissues will be collected for laboratory analyses. At 4-6 hours postnatal lambs will receive an IV bolus of SCs or an equal volume of sterile saline. This IV dose is aimed at modulation of the peripheral inflammatory/immune response, which is at the center of the pathophysiology of perinatal inflammatory stress-induced EoP [2].

### **Long term survival**

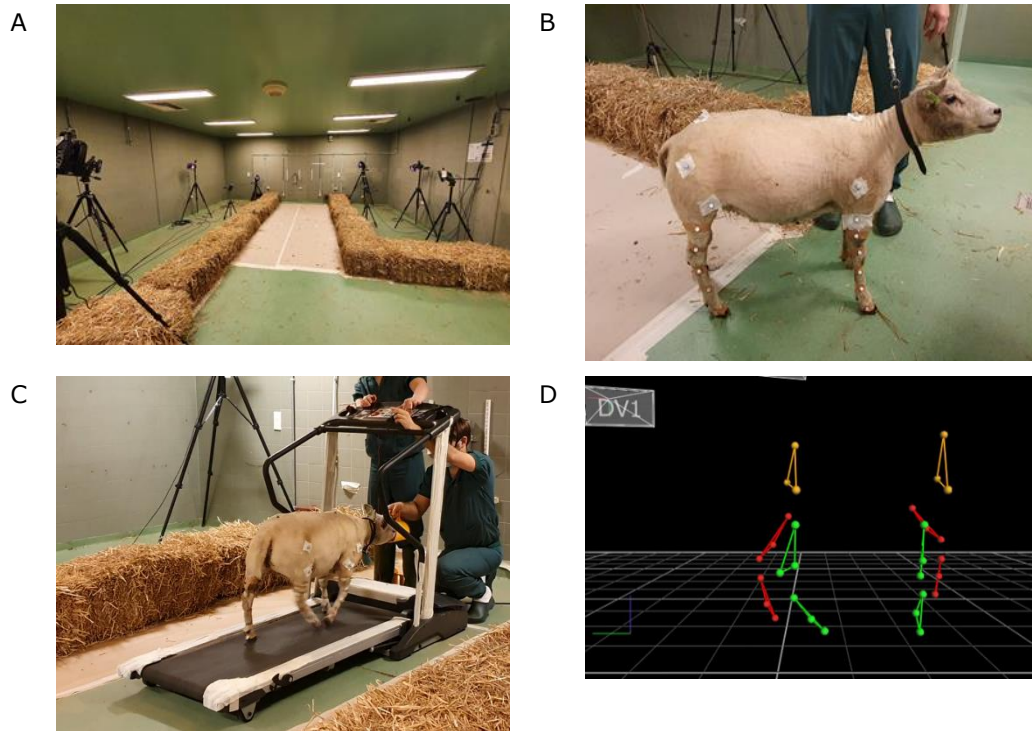
For the long-term follow-up, animals will be weaned of ventilator support according to established protocols. As soon as the lambs are independent of respiratory support, we will start our protocol for motherless rearing for as long as needed. In house care is provided until the lambs are able to be kept in the meadow. Blood samples will be taken during survival (max 1 blood draw per month, max 6 ml/kg bodyweight).

At two months animals will receive a 'delayed' intranasal (IN) dose of SCs or an equal volume of sterile saline (also IN). With this (delayed) IN dose the SCs will migrate into the damaged brain and act as a biologically responsive source of growth factors [3, 4].

Neurodevelopment will be monitored longitudinally at 2 months after preterm birth and at the end of the experiment (1 year) with MRI and EEG. EEG signals will be collected during the period when the sheep are under anesthesia for MRI scans, which will limit discomfort.

In addition, functional neurodevelopment will be assessed at 8 and 12 months with gait analysis (walking pattern) and maze testing (memory/cognition).

Gait analysis is performed in collaboration with colleagues from the department of exercise sciences and takes place in a stable at the central animal facility equipped with a special camera setup aimed at a catwalk over which the sheep walk up and down under the guidance of a researcher/caretaker (Fig. 2A). For this procedure, the sheep are leashed, which requires training in advance. As they walk along the catwalk, cameras will record reflectors placed at strategic locations (joints) on the sheep (Fig. 2B). The sheep will also walk on a treadmill at alternating speeds (Fig. 2C). Alternating speed often makes abnormal walking patterns even more evident. Walking on a treadmill also requires training. Figure 2D shows a processed image of the reflectors on the sheep. Gait analysis makes it possible to express movement patterns and disorders in number and size.



**Figure 2: Overview of gait analysis performed on sheep.** A. Sheep will be guided over a catwalk that is equipped with a camera setup; B. Sheep will be fitted with reflectors that are picked up by the camera system; C. Sheep will walk on a treadmill at alternating speeds; D. Example of a camera image.

Feasibility of maze testing will be tested in preterm born sheep from another protocol based on protocol set-up by Hunter, D.S., *et al.*, *Physiology & behavior*, 2015. **139**: p. 244-253. [5] and Murray, S.J., *et al.*, *Frontiers in Veterinary Science*, 2022. **9**. [6]. During these trials we will also determine the choice of maze that will be used (i.e. diamond vs. Y-maze). Maze testing will be performed in collaboration with institutional and international collaborators with experience in behavioral testing in rodents and sheep.

Briefly, sheep are trained to walk through a maze (example of diamond maze in figure 3) where all gates are open. As such, the sheep can exit the maze out of either arm. The side most frequently used to exit will be used in later tasks as their preferred side. Following training, the sheep will undergo a habituation task in which the sheep is guided down one of the maze arm to a closed gate and trained to turn around at the dead end and exit the maze through the other open arm. After training the memory task will be performed in which the sheep has to go down the maze by itself (preferred side) followed by a reversal task in which the gates are swapped at multiple times. Each sheep get multiple trials of a max of 5 minutes per trial. When a sheep exits the maze it will be rewarded in the 'reward' pen by allowing for close proximity with flock-mates, and access to a food reward during  $\geq 10$  second rest period between runs. If a sheep is not able to exit the maze (trial fail) it is guided out of the maze towards the 'reward' pen for  $\geq 10$  seconds.

Measures recorded during the maze tasks included total trials and time taken to complete each trial, numbers of vocalizations in each trial, and number of arm entries and average time per trial in criterion trials. Sheep are also classified according to the method they used to exit the maze (complete the task) within the three minutes available.

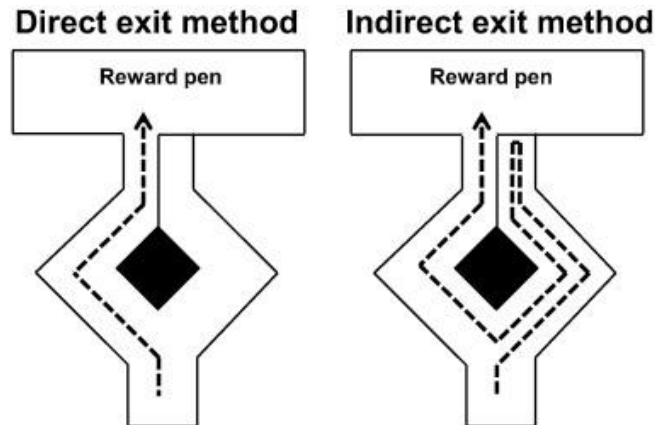


Figure 3 Example of a 'diamond' maze and different methods to exit the maze

For term reference controls, lambs are born at term and reared by the ewe. These lambs do not require ventilator support. These lambs will undergo identical experimental assessment procedures, including monthly blood sampling, MRI, aEEG, gait analysis, and maze testing and will serve as controls for the (adverse) effects of preterm birth.

For cell-tracing experiments, SCs will be equipped with multimodal nanoparticles. These nanoparticles enable ex vivo quantification and visualization of cells in a tissues and blood.

For the **short-term postnatal survival** this results in 4 groups:

1. Control – sham treatment (n=15)
2. Control – Stem cells IV (n=15)
3. LPS – sham treatment (n=15)
4. LPS – Stem cells IV (n=15)

For the **cell tracing experiments** this results in the following groups:

5. Control – Stem cells IV 'early' sacrifice @12 hours (n=7)
6. LPS – Stem cells IV 'early' sacrifice @12 hours (n=7)
7. Control – Stem cells IV 'early' sacrifice @72 hours (n=15)
8. LPS – Stem cells IV 'early' sacrifice @72 hours (n=15)

We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments (groups 7-8) and the proposed short-term experiments (groups 2 and 4) in the same animals. This will reduce animal numbers with 30 animals.

For the **long-term postnatal survival** this results in 5 groups:

1. Control – sham treatment (n=16)
2. Control – Stem cells IV 'early' & IN 'delayed' (n=16)
3. LPS – sham treatment (n=17)
4. LPS – Stem cells IV 'early' & IN 'delayed' (n=17)
5. Term born reference controls (n=12)

1. Nikiforou, M., *et al.*, *Inflamm Bowel Dis*, 2015. **21**(9): p. 2026-38.
2. Ophelders, D.R.M.G., *et al.*, *Cells*, 2020. **9**(8): p. 1871.
3. Oppliger, B., *et al.*, *Stem cells and development*, 2016. **25**(16): p. 1234-1242.
4. Thomi, G., *et al.*, *Stem cell research & therapy*, 2019. **10**(1): p. 1-16.
5. Hunter, D.S., *et al.*, *Physiology & behavior*, 2015. **139**: p. 244-253.
6. Murray, S.J., *et al.*, *Frontiers in Veterinary Science*, 2022. **9**.
7. Vaes, J.E., *et al.*, *Glia*, 2021. **69**(3): p. 655-680.
8. Wolfs, T.G., *et al.*, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2012. **25**(sup1): p. 8-11.

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

**Group sizes and statistics:**

Group sizes were calculated with G\*power. Based on previous (unpublished) sheep work, we detected an effect size of  $F=0.51$  for the number of cells/mm<sup>2</sup> that stained for microglial markers IBA-1 (measure for neuroinflammation) in the periventricular white matter between controls, LPS exposed and SC treated animals in an ovine model of perinatal inflammatory stress, comprising antenatal inflammation, preterm birth and postnatal mechanical ventilation (72 hours) Based on these data and assuming an ANOVA setting, with a power of 80%, and  $\alpha=0.05$  (two-sided) for 4 experimental groups we anticipate requiring **12** fetuses/group x 4 groups. Based on dropout rates for the short-term animals of 20%, we request **15** pregnant sheep and fetuses per group and **60** in total.

In the long-term experiments we have a 30% drop-out rate in non-exposed (sham, no LPS exposure) groups and a dropout rate of 35% for LPS exposed animals and 5% for term born references. Drop-out rates are based on previous experiment in this model. In the LPS-exposed groups are higher compared to non-exposed groups as these animals are more prone to (lethal) infections and require prolonged respiratory support (unpublished findings).

As such, we anticipate requiring **16** pregnant sheep and **16** fetuses per group in the non-exposed animals, **12** pregnant ewes and **12** lambs for the term born reference groups and **17** pregnant sheep and **17** fetuses in the LPS-exposed groups. In total, we require **78** ewes and **78** lambs for long-term experiments.

We estimate, based on the work by Vaes et al., [7] which showed significant higher migration of labeled stem cells towards the brain 12 hours after administration in injured animals with  $n=6$  animals, we estimate to require a similar number of animals. Similar to the short-term animals these lambs will undergo fetal instrumentation. However, the risk for dropout is lower in the animals that are planned to for 12 hours (10%) ventilation when compared to 72 hours ventilation (20%). As such, for 12 hour cell-tracing we estimate to need **7** ewes and **7** lambs per experimental group. In total we require **14** ewes and **14** fetuses. Similar to the short-term animals these lambs will undergo fetal instrumentation. However, the risk for dropout is lower in the animals that are planned to for 12 hours (10%) ventilation when compared to 72 hours ventilation (20%).

We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 30 animals.

Collectively, we will need a total of **152 pregnant ewes and 152 fetuses/lambs (total 304 sheep)**.

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Sheep	Breeder	Pregnant ewe	152	Female	n/a	n/a
2	Sheep	Breeder	>2/3 gestation	152	Male and Female	n/a	n/a

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<p>We have chosen Texel sheep for these experiments since ovine fetal development, in terms of white matter myelination, lung alveolarization and intestinal crypt formation, is comparable to human fetal development: both processes start prenatally and continue postnatally, whereas these processes start postnatally in rodents [8]. Moreover, the size of the ovine fetus/lamb allows for chronic <i>in utero</i> instrumentation and allows the use of ventilation equipment and ventilation strategies currently used in clinical practice. Furthermore, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes for most organs. Important, therapies that are now the golden standard in human neonatal care, such as antenatal steroids, surfactant replacement therapy and neonatal cooling were developed in preterm lambs.</p>
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Herkomst	Our sheep are purchased from a Texel sheep breeder, contracted by 5.1 lid2h that is able to perform time-mated breeding.
Levensstadia	Pregnant ewes with singleton fetuses (>2/3 of gestation). Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate <i>in utero</i> growth before transport to the animal facility.
Aantal	152 ewes and 152 fetuses
Geslacht	We will use pregnant ewes (female) and fetuses/lambs of both genders
Genetisch gewijzigd	n/a
Stam	n/a

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

During birth and shortly after birth (72 hours) of term reference controls, the ewes are housed individually. Individual housing, and later with the newborn lamb will reduce stress during labor, promote bonding between the mother and the lamb and enables researchers and caretakers to closely monitor feeding behavior of the newborn lamb.

During ventilation on the LICU, the lambs are placed individually on a radiant infant warmer bed since:

- The lambs are connected to equipment such as mechanical ventilators and infusion pumps.
- By placing the lambs individually enables us to regulate and adjust body temperature individually because each bed is equipped with a heat lamp. Body temperature is essential for amongst others respiratory function.
- Individual placement on the beds reduces the risk for potential infections caused by cross-contamination between lambs

Due to infection risks, we keep lambs from different experimental batches separate until they are vaccinated for the first time. We strive to have 3-4 lambs per batch, but in case the majority of animals from a single batch dies, the remaining animal needs to be placed in a new group. However, this will always be in consultation with the animal welfare officer/veterinarian who will assess the risks of placement in a new group. Until this assessment has been done, or in case the health risks are too big, the lamb will remain in individual housing, but within olfactory, auditory and visual distance of the other lambs.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

#### Ewe:

All surgical procedures will be performed under general anesthesia with analgesia (both systemically and locally) Analgesia will be continued after surgery for a minimum of 4 days. Welfare, including pain is assessed at least daily and additional analgesia is administered if needed and after consultation with a veterinarian.

**Fetus/lamb:**In utero:

Whilst on placental circulation (during fetal instrumentation and first part of Caesarean section), the fetus/lamb is sedated through anesthesia of the ewe that crosses the placental barrier.

Postnatal:

Postnatally, the (non-sedated/non-anesthetized) lambs receive analgesia (intravenous) to reduce potential discomfort that arises from the endotracheal tube. After extubation, analgesia is discontinued. Moreover, vital parameters are continuously (24 hours/day) monitored on the lamb intensive care unit by skilled personnel trained to recognize discomfort or complications potentially leading to discomfort and act upon recognition to prevent (further) discomfort).

---

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

**For the ewes the following complications that influence well-being might arise:**

- Intra-uterine fetal death leading to abortion
- Abdominal hernia
- Post-operative infections
- Post-operative gastro-intestinal complications (reduced rumination or ileus) leading to a negative energy balance

**For all fetus/lambs (both short-term and long-term), the following complications might arise that influence well-being:**

- Pain
- Hemodynamic instability
- Respiratory complications (pneumothorax, hypoxia, acidosis)
- Hypoglycemia
- Malnourishment
- Infection (systemic and local)
- Gastro-intestinal complications (diarrhea, infection)

**For lambs that are planned for long-term survival, the following complications might arise in addition to the aforementioned complications:**

- Urinary calculi
- Arthritis
- Shortness of breath

---

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

**Ewe:**

- Abortion might occur due to fetal death caused by fetal instrumentation and/or intrauterine infection. However, this is uncommon in this species, and therefore, a major reason to use this species;
- All ewes undergo laparotomy that needs to be closed with sutures. In case pressure on the wound increases due to rumination (coughing up food) there is a risk that the tissue around the suture entrance point of the suture itself tears. This will result in a permanent 'hole' (hernia) in the abdominal wall through which the intestines might herniate leading to severe intestinal ischemia, pain and death.
- Although the ewes are operated on aseptically, they have a permanent wound in their flank through which the catheters are exteriorized. This wound might serve as an entrance point for infectious organisms that persists until the Caesarean section and is a possible risk for infection.
- Due to abdominal surgery or postoperative pain, motility of the maternal intestines might temporarily be reduced or completely absent. This might lead to an intestinal obstruction, reduced food intake and absorption leading to a negative energy balance for the pregnant ewe with potential lethal consequences, also for the fetus.

**Fetus/lamb:**



- Pain might occur due to increased oxygen need during mechanical ventilation, or due to invasive procedures.
- Respiratory complications (pneumothorax, hypoxia, and acidosis) might occur to immaturity of the respiratory system.
- Hemodynamic instability might occur due to an underdeveloped cardiovascular and respiratory system.'
- Preterm lambs are naturally sensitive for infection due to an underdeveloped immune system. These lambs are equipped with arterial and venous catheters that are potential entrance points for infectious microorganisms into the circulation.
- Entrance points of vascular catheters (porte d'entree) in the lambs might become infected by environmental microorganisms.
- Hypoglycemia might occur due to increased glucose need during ventilation.
- Malnourishment might occur due to motherless rearing and reduced oral intake.
- Gastro-intestinal complications might occur due to prematurity and malnourishment.
- Urinary calculi might form due to (1) underdeveloped renal calcium excretion system due to prematurity often in combination with a urinary tract infection and a mineral dysbalance. These calculi can permanently obstruct the urethra, preventing the lamb to urinate and leading to an overfilled bladder and pain. This complication especially arises in male lambs as they have a sigmoid flexure in the urethra.
- Arthritis in sheep is caused by a bacterial infection of the joints. It usually occurs in young sheep when bacteria localize in the joints after entering the body through the umbilical cord.
- Shortness of breath is predominantly caused by inadequate removal of mucus since the lambs might not be able to cough up mucus. This, in combination with a high work of breathing (retractions and high breathing frequency) that all preterm lambs have in the first weeks, might cause the lambs to become hypoxic.

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

**Ewe:**

- Abortion by itself cannot be prevented. However, recognition of intra-uterine fetal demise and/or pending preterm labor will prevent additional discomfort. Depending on the experimental set-up (need for fetal instrumentation) *in utero* fetal well-being will be checked by daily blood gas analysis. Our staff is trained to recognize symptoms of pending labor. Fetal demise and/or pending preterm labor are described as humane endpoints.
- Abdominal hernia is prevented by the use of a double loop suture that is especially suitable in cases where extended wound support and strength are required.
- Infection will be prevented by aseptic procedures during surgery combined with the use of antibiotics and proper wound care (i.e. antimicrobial spray on wounds).
- Reduced motility is prevented by proper analgesia in combination. In addition, the ewes are not individually housed anymore as this prevented them from walking around. Walking is a strong stimulator of intestinal motility.

**Fetus/lamb:**

- During surgery, the fetus/lamb is anesthetized through the ewe and will receive analgesia via the ewe (medication crosses the placenta). During mechanical ventilation, pain will be targeted via intravenous administration of analgesia.
- Proper ventilation strategies and assessment of vital parameters (blood gas, blood pressure) will prevent adverse physiological reactions (acidosis). Surfactant replacement therapy (standard care) in combination with mechanical ventilation will prevent hypoxia. Pneumothorax will be defined as a humane endpoint.
- Hemodynamic instability will be controlled by transfusion of blood (from placenta) immediately after birth, intravenous infusion of saline combined with electrolytes, and if necessary inotropic agents.
- Adequate enteral and parenteral feeding strategies will prevent hypoglycemia, which is checked regularly in combination with blood gas analysis and other electrolytes.
- Infections are prevented by:
  - o aseptic surgical techniques

- strict hygiene and disinfection protocols during procedures and around vascular catheters
  - prevention of cross contamination between animals
  - personal hygiene measures
  - daily cleaning and disinfection of the intensive care environment
  - Prophylactic antibiotics
  - Culture of vascular catheter line tips incl. antibiogram to ensure proper use of antibiotics, but also reduce the risk for resistance.
- Malnourishment will be prevented by continuous monitoring of 'eating behavior', manual feeding if necessary, and offering a varied diet. Proper feeding will also prevent postnatal gastro-intestinal complications.
  - Formation of urinary calculi is prevented by ensuring adequate oral intake of fluids, especially water, infection prevention and a well-balance mineral intake (phosphorus and calcium) in the form of pellet food and hay grass. Regular assessment of urine sediment is performed to assess potential formation of calculi.
  - Arthritis can be prevented by proper infection prevention. In addition, regular disinfection of the umbilical cord is important.
  - Shortness of breath will be prevented by regular pulse oximetry measurements in combination with auscultation of the lungs. If the lambs is hypoxic, oxygen supplementation treatment can be applied in combination with nebulization of medicaments to (1) ease the work of breathing and (2) to tackle underlying causes such as mucus plugs.

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

### Humane endpoints for ewes

- Pending preterm labor
- Intra-uterine fetal death (checked by absence of fetal blood pressure, and blood pH < 6.8)
- Sepsis/ infection not responding to treatment
  - Local (at the site of catheter exit in flank): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint.
  - Systemic: Combined and persistent signs of infection (elevation of the body-temperature plus tachypnea or high pulse plus impaired feeding), lethargy, excessive time lying down -> evaluation by researcher in consult with veterinarian
- Maternal metabolic problems (pregnancy toxemia). Insufficient intake of food can lead to decreased blood glucose levels and subsequent ketosis. Food intake and gastro-intestinal activity (rumination, rumen sounds, borborygme, and defecation) should be monitored daily. The cause of decreased food intake (e.g. post-operative pain) should be investigated with help of a veterinarian. If a ewe does not respond to treatment of decrease blood glucose (IV glucose or Propylene glycol) and/or pain medication a HEP is reached.
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)  
Assessment of pain:
  - Lack of appetite
  - Grinding of teeth
  - Reluctance to stand/ excessive time lying down
  - Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort

### Humane endpoints for fetus (*in utero*)

- Hypoxia-ischemia (decreased blood-pressure, decreased heart rate, decreased blood pH (< 7.0), elevated blood CO<sub>2</sub>, decreased blood O<sub>2</sub> and saturation)
- Severe sepsis leading to hypotension and severe metabolic acidosis (pH twice < 7.0) as determined by blood gas analysis.

### **Humane endpoints for lamb (short-term postnatal and cell tracing)**

- Unsuccessful (re-)intubation mandating tracheotomy:
  - o Intubation complicated by vocal cord spasms can lead to severe respiratory distress. Intubation is always performed under supervision of a highly trained personnel member and/or a neonatologist. In case of a vocal cord spasm, specific medication can be used to reduce or prevent spasm. If intubation remains impossible, the lamb can be intubated by tracheotomy. However, tracheotomy in animals that are awake causes severe discomfort and therefore continuous sedation is needed that influences the outcome of the fetus. In addition, lambs that have undergone tracheotomy are not eligible for postnatal survival since the procedure of restoration of the tracheotomy causes severe discomfort. As such, we defined this as a HEP
- Pneumothorax:
  - o Blood gas analysis (pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>), saturation (pulse oximetry): these parameters are monitored and documented. Target ranges are defined to control ventilation and to identify need for surfactant re-dosing. Rapid changes indicate ventilation complications such as pneumothorax or atelectasis, which can be verified by auscultation, ultrasound or chest X-ray. Pneumothorax may be treated by means of a thorax drain. Pneumothorax can dramatically impair fetal well-being with continuous severe discomfort. Moreover, pneumothorax, regardless of treatment, is a confounder in the experiment that will critically influence experimental outcomes.
- Uncorrectable severe acidosis:
  - o Severe acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis which cannot be corrected by Sodium bicarbonate treatment is considered a HEP.
- Sepsis with uncorrectable hypovolemia
  - o Severe sepsis leading to hypotension (MAP < 20 mmHg) and severe acidosis (pH twice <7.0) as determined by blood gas analysis is a humane endpoint.
- Multi-organ failure

### **Humane endpoints for lamb (long-term)**

- Congenital malformations that are not compatible with long-term survival (anatomical malformations, extreme low birth weight for GA (<60% of average weight for GA))
- Unsuccessful weaning of ventilator support
  - o FiO<sub>2</sub> > 0.50 at 72 hours of ventilation
  - o SaO<sub>2</sub> < 80% for more than 1 hour with a maximal flow of 15L/min and FiO<sub>2</sub> of 1.0
  - o Extubation failure after a third weaning attempt.
  - o Need for O<sub>2</sub> treatment of ventilator support 7 days after extubation.
- Untreatable Infection/inflammation:
  - o Local (e.g. after venipuncture): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint.
  - o Systemic: Combined and persistent signs of infection (elevation of the body-temperature plus tachypnea or high pulse rate plus impaired feeding), lethargy, excessive time lying down -> evaluation by researcher in consult with veterinarian
- Gastro-intestinal (untreatable bloat)
- Failure to thrive
  - o Insufficient weight gain with respect to size and body composition. Normal growth for term Texel lambs during suckling is 300 g/day. Due to prematurity, growth rates might be lower in our experiment. The lambs are weighed every day and measured weekly (crown-rump length) and growth curves will be made. If weight (gain) in relation to growth of the lamb stagnates or decreases >20% this will be a humane endpoint.
  - o Inability to independently reach food and water
- Urinary calculi leading to obstruction of urethra and inability to void bladder. In case treatment (urinary catheter insertion and bladder flush) is not possible or with recurrent obstruction.
- Unsuccessful recovery from anesthesia during 2 month MRI:
  - o FiO<sub>2</sub> > 0.40 at 12 hours post MRI
  - o SaO<sub>2</sub> < 80% for more than 1 hour with a maximal flow of 15L/min and FiO<sub>2</sub> of 1.0

- Extubation failure after a second weaning attempt.
- Need for O<sub>2</sub> treatment of ventilator support 72 days after extubation.

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

Ewe: 10%  
 Lambs short-term and 72 hours cell tracing: 20%  
 Lambs 12 hour cell tracing: 10%  
 Lambs long-term non-exposed: 30%  
 Lambs long-term LPS-exposed :35%  
 Term born reference controls: 5%

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

We have summarized all procedures that might influence the discomfort of the ewes and lambs with the corresponding estimated discomfort:

Procedure	Frequency	Discomfort	
<b>Antenatal/ in utero:</b>			
		<b>Ewe:</b>	<b>Fetus/lamb:</b>
Pre-anesthesia check incl. ultrasound	1x	Mild	None
Instrumentation under general anesthesia	1x max 2 hours	Moderate	Mild
Postoperative antibiotics (intramuscular)	4 days 2dd	Mild	n/a
Intra-amniotic exposure to LPS	1x	Mild	Mild
Corticosteroids injection (intramuscular)	1x	Mild	
C-section (modified EXIT, including intubation and if needed (long term study) placement vascular catheters) under general anesthesia	1x max 30 minutes	Mild	Short-term and tracing: Mild  Long-term: mild-moderate
Spontaneous birth (term born references)	1x	Mild	n/a
Euthanasia (general anesthesia)	n/a	Non-recovery	n/a
<b>LICU:</b>			
Placement lambs on individual beds (radiant infant warmer)	72 hours	n/a	Mild
Mechanical ventilation (no sedation)	72 hours	n/a	Moderate
Intravenous administration stem cells in pre-existing catheter	1x	n/a	None
Blood drawing in pre-existing catheters for bloodgas (0.2 mL)	>10x	n/a	None
Blood drawing for laboratory analysis (pre-existing catheter)	1x during C-section (2mL) 2x (daily) via pre-existing catheters (2mL)	n/a	None
Finger feeding	Every 2-4 hours	n/a	Mild
EEG	Continuous 72 hours	n/a	Mild
Ultrafast Doppler ultrasound (in rest/sleep)	Max 3x 15 minutes	n/a	Mild

Euthanasia (only short term and tracing; under sedation)	1x	n/a	Mild
<b>Long-term postnatal:</b>			
Weaning off ventilator support		n/a	Mild/Moderate
MRI (general anesthesia)	1x at 2 months (including recovery)	n/a	Moderate
	1x at 12 months (end of experiment)		Non-recovery
Blood collection	1x during C-section (general anesthesia)	n/a	None
	9x in stable		Mild/moderate
	2x during MRI under general anesthesia		None
EEG	2x during MRI (general anesthesia)	n/a	Mild
Ultrafast doppler	2x during MRI (general anesthesia)	n/a	Mild
Gait analysis incl. training	At 8 and 12 months	n/a	Mild
Maze testing incl. training	At 8 and 12 months	n/a	Mild
Euthanasia (general anesthesia MRI)	1x	n/a	Mild

Ewe: **moderate** (recovery after abdominal surgery, euthanasia immediately after C-section under general anesthesia)

Ewe (term born references): **mild** (delivery of lambs)

Lamb short-term: **moderate** (mechanical ventilation under minimal sedation)

Lamb long-term: **moderate** (mechanical ventilation with minimal sedation, postnatal survival incl. anesthesia for MRI, blood collection, and other experimental procedures)

Lambs term reference control: **moderate** (anesthesia for MRI, blood collection, and other experimental procedures)

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p><b>Replacement:</b></p> <p>Animal experiments are needed because the patients for who this new therapy is developed are premature babies, who are extremely vulnerable and susceptible for injury and organ damage with potential life-long consequences. Currently there are no suitable alternatives for the complex events of antenatal infection/inflammation (chorioamnionitis), preterm birth and postnatal intensive care. In this is a translational study, the contribution of a multitude of organ systems that are involved in the pathogenesis of EoP will be studied. This in combination with multiple application routes and long-term functional outcomes cannot be assessed solely <i>in vitro</i>. Moreover, the required biological samples to assess the outcome parameters cannot be sampled from humans. Importantly, we use state-of-the-art culture techniques (organoids) from postmortem acquired tissues from sheep and human tissues acquired during surgery to investigate sub-questions in this project. However, these <i>in vitro</i> assays cannot replace the complex setting of EoP, thereby mandating animal experiments.</p>
Vermindering	<p><b>Reduction:</b></p> <p>Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to reduce drop-out rates. Our experiments are conducted by highly</p>

	<p>experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between gender since our clinical population consists of both sexes.</p> <p>With the use of state of the art culture techniques (organoids from post-mortem tissues), we are able to answer research questions that initially would require additional animals.</p> <p>By using non-invasive techniques such as MR imaging, we enable longitudinal assessment of neurodevelopment in a single animal that would otherwise only be possible postmortem.</p> <p>We will perform the proposed 72 hours cell-tracing experiments and the proposed short-term experiments in the same animals. This will reduce animal numbers with 22 animals. Moreover, we will combine our long-term control groups for IV and IN administration, as the effects of both sham treatments (IV saline or IN saline) can be ignored.</p>
Verfijning	<p><b>Refinement:</b></p> <p>The choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, the developmental biology of sheep and humans is very similar. For example, white matter myelination in lambs and humans starts before birth, compared to rodents in which this process starts postnatal. Therefore, we have established an animal model of immature neurodevelopment in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice.</p> <p><u>Ewe:</u></p> <p>We have adjusted post-operative housing requirements from solitary housing to group housing. This has resulted in reduced postoperative complications, including infection, motility abnormalities and fetal demise. Moreover, group housing has improved well-being of the ewes as these conditions enable natural behavior.</p> <p>Our experiments will be conducted by a highly trained staff that has been trained to recognize and act upon discomfort such as pending labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.</p> <p><u>Lambs:</u></p> <p>Ventilation with sedation on indication in combination with positioning of the fetus in a sling with free movement of the legs enables the lamb to maintain blood pressure and prevent complications associated with alterations in blood pressure such as edema and capillary leakage. In addition, presence of a suckling reflex will enable peristalsis and therefore make enteral feeding with colostrum possible, which is essential for survival and well-being of the newborn lamb.</p> <p>We keep all lambs as much as possible in groups (minimal 2) to ensure more natural behavior (less focus and reliance on humans) and reduced stress.</p> <p>Furthermore, the lambs on the lamb intensive care unit are continuously monitored 24 hours/day by a highly trained and experienced team enabling early recognition of complications and discomfort and to act upon recognition. Moreover, we have actively acquired input from clinical professionals (nurses) who work on the Neonatal Intensive care Unit with regard to hygiene, infection prevention, medication, and use of reusables/disposables. This has resulted in reduced number of infections and increased neonatal survival.</p>
Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?	
<input checked="" type="checkbox"/> Nee	
<input type="checkbox"/> Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.	

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

## I. Herhaling

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

n/a

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

The ewes that give birth (natural delivery) to the term reference control lambs, will be offered for adoption.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Ewe: all ewes will be euthanized at the end of the experiment since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection and abdominal surgery.

Lambs: all lambs will be humanely euthanized at the end of the experiment as postmortem laboratory analyses of tissues and organs is crucial to determine our outcome parameters.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

All animals will be euthanized by an intravenous injection with an overdose sodium pentobarbital following sedation/general anesthesia.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.





# Advies aan CCD

Datum 08 april 2022  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215869

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity  
Aanvraagnummer: AVD202215869  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	<p>vragen over de NTS:</p> <p>In de laatste alinea onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' van uw NTS noemt u dat een gedeelte van de lammeren beademd zal worden. Kunt u in deze alinea ophelderen waarom dit gebeurt en wat het verschil is tussen de verschillende groepen vroeggeboren dieren?</p> <p>Kunt u in uw NTS onder het kopje 'Verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren' benoemen dat een deel van de dieren zullen worden gedood?</p> <p>Vraag over de bijlage dierproeven:</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven aan dat de pasgeboren lammeren individueel gehuisvest worden op de intensive care unit. Daarnaast geeft u ook aan dat er een kans is dat dieren later individueel gehuisvest kunnen worden mocht een deel van de groepsgenoten uitvallen. Kunt u het ongerief dat de dieren ondergaan tijdens de individuele huisvesting van zowel de huisvesting op de ICU als later na scheiden van groepsgenoten meenemen in de tabel ongeriefbepaling onder 'F. Classificatie van ongerief'?</p> <p>Vraag over het projectvoorstel:</p>
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	In communicatie met de DEC heeft de DEC u verzocht aan te geven of het weghalen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kunnen zijn bij de ontwikkeling van de lammeren. Kunt u met referenties en/of eerdere data aangeven waarom dit, volgens u, niet het geval zou zijn?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>				
	Schape (Ovis aries)		304	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival

Citaat:

During birth and shortly after birth (72 hours) of term reference controls, the ewes are housed individually. Individual housing, and later with the newborn lamb will reduce stress during labor, promote bonding between the mother and the lamb and enables researchers and caretakers to closely monitor feeding behavior of the newborn lamb.

Due to infection risks, we keep lambs from different experimental batches separate until they are vaccinated for the first time. We strive to have 3-4 lambs per batch, but in case the majority of animals from a single batch dies, the remaining animal needs to be placed in a new group. However, this will always be in consultation with the animal welfare officer/veterinarian who will assess the risks of placement in a new group. Until this assessment has been done, or in case the health risks are too big, the lamb will remain in individual housing, but within olfactory, auditory and visual distance of the other lambs.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival

Schape (Ovis aries)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat:  
We will use pregnant ewes (female) and fetuses/lambs of both genders

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat vraag 31 DEC aan aanvrager: Het is onduidelijk of de lammetjes die aan de mechanische ventilatie liggen wakker zijn of onder anesthesie?  Citaat antwoord van aanvrager op vraag 31:
-------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

De lammeren zullen tijdens mechanische ventilatie wakker zijn om de volgende reden:

In voorgaande experimenten waarin lammeren 72 uur beademd werden, zijn wij complicaties tegen gekomen die uiteindelijk hebben geleid tot een humaan eindpunt.

Deze complicaties waren als volgt: Na 48 uur maken alle lammeren een periode door die gekenmerkt wordt door (1) hypotensie; (2) capillary leakage en oedeem; (3) afwezigheid van maaglediging en (4) metabole acidose.

Wij hebben de beschreven complicaties besproken met Prof. Jane Pillow (University of Western Australia). Zij is expert in ventilatiemodellen en op basis van haar advies hebben wij de volgende aanpassingen succesvol doorgevoerd.

Door de houding van de lammeren te wijzigen van buik- en zijligging naar een buikligging in een hangmat met vrije beweeglijkheid van de poten in combinatie met sedatievrije beademing zal het lam in staat zijn om zelfstandig zijn bloeddruk en de complicaties gerelateerd aan bloeddrukschommelingen onder controle kunnen houden.

Door de lammeren tijdens de beademing niet te sederen hebben ze een zuigreflex waardoor ze actief gevoed kunnen worden, wat zal resulteren in adequate maaglediging en peristaltiek en daardoor preventie van o.a. metabole acidose. Daarnaast is peristaltiek en opname van o.a. antilichamen uit biest (colostrum) in de eerste 72 uren na de geboorte cruciaal voor de overlevingskans van lammeren, en vroeggeboren lammeren in het bijzonder.

Citaat C9:

- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

De pasgeboren lammeren zullen sedatievrij worden beademd op de intensive care unit. De 5.1 lid2h heeft hierover een vraag gesteld aan de onderzoekers. De onderzoekers geven aan dat de keuze hiervoor een verfijning is o.b.v. eerdere ervaringen met het model. Door lammeren niet te sederen is het lam in staat om zelf fysiologische parameters zoals bloeddruk en maagperistaltiek te reguleren. Dit heeft positieve effecten op het welzijn en de overleving van de lammeren.

Citaat C10:

De 5.1 lid2h heeft zich ervan verzekerd dat dit het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt J in de bijlagen. Er wordt naar gestreefd om alle dieren in groepen te huisvesten, maar oaien zullen rondom de geboorte tijdelijk kortdurend apart worden gehuisvest om complicaties te voorkomen. Er is een kleine kans dat

opgroeiende lammeren tijdelijk alleen gehuisvest zijn, als alle groepsgenoten zouden uitvallen en er een nieuwe groep gevormd moet worden.

Citaat vraag 15b DEC aan aanvrager:

Zou het daarmee mogelijk zijn om de ooiën in de controlegroep niet te hoeven doden, en aan te bieden voor adoptie. In de veehouderij komt een keizersnede ook regelmatig voor en is dat niet per sé een reden om een ooi te doden.

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 15b:

De lammeren worden preterm via keizersnede geboren. De keizersnede zelf gebeurt onder volledige anesthesie. Voor de ooi zelf betekent dit gering ongerief. Indien de ooi moet bijkomen uit anesthesie en herstellen van de keizersnede, zal ze meer ongerief ondervinden: minimaal matig de eerste dagen na de ingreep gradueel afnemend naar gering tot volledig herstel. Daarnaast zal tijdens de keizersnede ook de alle wonden t.g.v. de instrumentatie (uittredeplaatsen katheters in baarmoeder en flank) moeten worden hersteld. Daarbij is het risico op complicaties na keizersnede voor de ooi verhoogd, met name omdat de keizersnede gebeurt op een moment dat de ooi nog niet in partus is (vroeggeboorte) en dus baarmoeder en placentomen (cotyledonen) ook nog dysmatuur zijn. Hierdoor kan de nageboorte blijven staan, met als gevolgen een baarmoederontsteking. Hierdoor kan de herstelperiode na operatie verlengd zijn met langer en hoger ongerief voor het dier.

Een ander aspect is de vraag wat met de ooiën zou gebeuren als ze in leven gelaten worden en het herstel van de operatie hebben doorgemaakt. Hergebruik in een ander experiment zou opnieuw lijden tot ongerief. Op dit moment zijn er ook geen lopende onderzoeken in volwassen schapen in onze instelling. Uit eerdere ervaring uit ons onderzoeksgroep heeft de net doorgemaakte zwangerschap ook invloed op een aantal fysiologische parameters. Bij voorbeeld veranderen tijdens de zwangerschap de longen en het cardiovasculair stelsel. Het gebruik van deze dieren in een studie samen met niet zwangere dieren wordt daardoor wel beperkt. Om wel gebruik te maken van de dieren hebben wij in de afgelopen jaren regelmatig lichaamsmateriaal van opgeofferd ooiën aangeboden aan andere laboratoria. Op die manier kunnen zij hun lab technieken testen en verfijnen, waardoor de kwaliteit van onderzoek in schapen in de toekomst verbeterd wordt. Verder wordt met lichaamsmateriaal in vitro werk op bepaalde vraagstellingen gedaan, zonder dat extra proefdieren nodig zijn.

Samenvattend, zijn wij daarom van mening dat het bijkomende vermijdbaar ongerief voor het dier zwaarder weegt dan het doel het dier voor een onzekere toekomst in leven te houden.

Citaat C20:

Het grootste gedeelte van de ooien zal moeten worden gedood omdat de gevolgen van het aanbrengen van intra-amniotische katheters, toediening van LPS en de gevolgen van de keizersnee te veel ongerief veroorzaken en hergebruik in de weg staan. De 5.1 lid2h heeft de onderzoekers hierover vragen gesteld en de onderzoekers hebben voldoende aannemelijk gemaakt dat overleving van deze ooien niet realistisch is. De ooien die de controle lammeren op de normale tijd en manier ter wereld brengen zullen niet worden gedood en ter adoptie worden aangeboden.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van preterme geboorte, op tegen de opoffering het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan?

2.

o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel

o Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de industrie bevorderd worden: reëel voordeel.

De 5.1 lid2h is van mening dat de belangen van toekomstige te vroeg geboren kinderen en hun naasten die te maken hebben met hersenschade, achterblijvende ontwikkeling of zelfs overlijden, alsmede de belangen van onderzoekers en bedrijven, die meer inzicht krijgen in de effectiviteit en optimale strategie voor een stamceltherapie binnen het project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot mild ongerief, of de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Alle lammeren en een deel van de ooien zullen opgeofferd worden aan het einde van de experimentele procedures, en worden daardoor de waarde van leven ontnomen. Alleen de ooien die a terme lammeren zullen ter adoptie worden aangeboden. De onderzoekers geven aan dat voor 96% van de dieren het ongerief matig zal zijn, en voor 4% van de dieren mild.

De integriteit van de schapen wordt met name aangetast door de keizersnede en het plaatsen van katheters. In een gedeelte van de lammeren zal de ontwikkeling na een aantal maanden gevolgd worden met beeldvormende technieken en gedragstesten. 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.

Wereldwijd worden er jaarlijks 15 miljoen baby's te vroeg geboren, waarvan 12.000 in Nederland. Door vroeggeboorte is er kans op allerlei schadelijke neurologische effecten voor de lange termijn, de Encephalopathy of Prematurity (EoP). Indien de doelstellingen bereikt worden, zullen de onderzoekers kennis vergaren over de effectiviteit en te hanteren strategie van een veelbelovende stamceltherapie voor EoP. Dit onderzoek biedt daarmee perspectief op een meer effectieve therapie waardoor de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten. Vandaar dat de [5.1 lid2h](#) 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.

De [5.1 lid2h](#) beantwoordt de centrale morele vraag 'Weegt in het voorgestelde onderzoek "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" naar een stamceltherapie ter voorkoming en behandeling van hersenschade als gevolg van pre-terme geboorte, op tegen de opoffering, het ongerief als gevolg van chirurgische ingrepen, mechanische ventilatie, bloedafname, beeldvormende technieken, gedragstesten en de aantasting van integriteit die de proefdieren (schapen) wordt aangedaan bevestigend. De [5.1 lid2h](#) onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening wegen de substantiële belangen van onderzoekers en toekomstige patiëntjes en hun naasten en de reële belangen van de industrie in dit project, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren. De [5.1 lid2h](#) 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 de voorgestelde 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, zoals duidelijk uit hun voorstel

blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De 5.1 lid2h 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 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h het projectvoorstel "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity" van een positief advies.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Een minderheidsstandpunt werd ingenomen door een 5.1 lid2h lid. Dit lid had bezwaren tegen de experimentele opzet van het onderzoek. De onderzoekers hebben niet overtuigend middels data aangetoond dat het zonder ooi opgroeien van pre-term lammeren geen extra confounder creëert ten opzichte van a-term geboren lammeren die opgroeien bij de ooi in relatie tot de uitkomstmaat van cognitieve en locomotieontwikkeling. Hiermee is de wetenschappelijke kwaliteit van het onderzoek in gevaar, en daarmee ook de ethische acceptatie van onderhavig onderzoeksvorstel.

Citaat vraag 17 DEC aan aanvrager:

Zijn lammetjes die a term geboren worden en door de moeder worden grootgebracht een goede /optimale controle? De experimentele groep wordt én te vroeg geboren, én groeit op zonder moeder. Voor de 5.1 lid2h klinkt dit als een dubbel nadeel/dubbele stress voor het gezond (op)groeien van de lammetjes. Zou het op een of andere manier mogelijk zijn om de te vroeggeboren lammetjes ook bij een/hun moeder op te laten groeien? Creëert dit geen confounder m.b.t. ontwikkeling?

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 17:

Het is helaas niet mogelijk om de vroeggeboren lammeren op te laten groeien bij een (surrogaat) moeder omdat de periode tussen geboorte en hereniging te lang is en de ooi het lam zal verstoten. Daarnaast zijn vroeggeboren lammeren zeer gevoelig voor infecties/ziekten die een ooi van nature bij zich draagt. Op basis van ervaring met lange termijnstudies in schapen door onze en andere groepen zijn wij ervan overtuigd dat moederloze opfok geen confounder is in het experiment.

Citaat bijlage III DEC advies, aanvullende vraag aan aanvrager:  
Het is duidelijk waarom te vroeggeboren lammeren niet kunnen opgroeien bij een surrogaatmoeder. Het is minder duidelijk waarom u ervoor kiest om de a terme lammeren niet ook zonder moeder te laten opgroeien, anders dan dat dit minder ongerief voor de dieren zal betekenen. Deze keuze lijkt een schonere vergelijking op te leveren, wat is daarop uw visie? U stelt dat u ervan overtuigd bent dat er geen sprake van zal zijn van een confounder effect o.b.v. eerder onderzoek. Kunt u deze stelling in de aanvraag onderbouwen met data of literatuurverwijzingen?

Citaat antwoord aanvrager bijlage III:

In de geplande studie setup vergelijken wij een 'ernstig zieke' groep (LPS-prematuriteit-ventilatie) met een 'zieke' groep (prematuriteit-ventilatie) en een gezonde controlegroep. In de laatste groep is het belangrijk een goede referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt. Hiertoe zijn spontane bevalling op à terme leeftijd en voeding via de moeder meegenomen als natuurlijke elementen om een zo'n best mogelijke start na te bootsen en daarmee een zo gezond mogelijke controlegroep te creëren. Als gunstige bijkomstigheid is er geen sprake van dieren ongerief van de à terme controlegroep. De enige confounder kan ontstaan bij een gedragstest gedragstest; de fles gevoede dieren zijn vanaf de eerste dag gewend aan mensen. Wij zijn ons hiervan bewust en zullen dit ondervangen in het trainen van de dieren. Daarnaast zullen de à terme lammeren ongeveer 2 maanden na geboorte worden gescheiden van de moeder en worden opgenomen in de kudde preterme schapen. Hier zal al een deel van het aangeleerde gedrag van de preterme schapen worden overgedragen naar de à terme lammeren. De gedragstesten zullen plaatsvinden 6 maanden plaatsvinden na samenvoegen van de kudde.

De volgende dilemma's zijn signaleerd door de DEC:

Citaat E3:

De **5.1 lid2h** had initieel veel vragen bij uitvoeringsaspecten van het project en de invloed daarvan op de waarde van de resultaten. Deze



vragen zijn door de onderzoekers uitgebreid beantwoord en hebben tot bijstelling van het voorstel geleid. Er is in de vergadering ook gesproken over of deze dierproeven bijdragen aan het verder verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen, en de wenselijkheid daarvan. De onderzoekers is gevraagd hierop te reflecteren. De onderzoekers hebben naast deze reflectie in hun antwoord ook aangegeven dat dit onderzoek niet primair gericht is op extreem te vroeg geboren kinderen maar met name op het kunnen behandelen van onvermijdelijke vroeggeboorten na 28 weken zwangerschapsduur, waarvoor een duidelijke klinische behoefte aan betere therapie bestaat.

Citaat vraag 2 DEC aan aanvrager:

Hersenaandoeningen t.g.v. vroeggeboorte (EoP) zijn deels ook een consequentie van het feit dat prematuur geboren kinderen in een steeds eerder stadium in de zwangerschap in leven kunnen worden gehouden. Uiteraard heeft dat dan gevolgen voor de ontwikkeling van (het brein van) deze kinderen. Kunt u reflecteren op de vraag of er grenzen zijn aan deze ontwikkeling en in hoeverre het door u voorgestelde dierexperimenteel onderzoek het oprekken van de grens nog verder stimuleert?

Citaat antwoord van aanvrager op vraag 2:

Dierexperimenteel onderzoek heeft in de afgelopen decennia een belangrijke bijdrage geleverd in het verbeteren van de geboortezorg. Hierdoor kunnen we vroeggeboren kinderen een steeds betere kans geven op een gezond leven.

Bij de ethische vraagstukken rondom de grens van levensvatbaarheid en extreme vroeggeboorte speelt dierexperimenteel onderzoek echter een zeer beperkte rol. Anders gezegd, dierexperimenteel onderzoek is niet de drijvende kracht achter de verschuiving van de grens van levensvatbaarheid, maar eerder een antwoord daarop om deze kinderen een optimale kans te geven. Het is uiteraard wel onvermijdelijk dat de vooruitgang in perinatale zorg, die dus deels door dierexperimenteel onderzoek gestimuleerd is, gepaard gaat met een verschuiving van de grens van levensvatbaarheid.

In het kader van dit projectvoorstel is het overigens belangrijk om te realiseren dat wij ons niet zo zeer richten op extreme vroeggeboorte (< 28 weken), maar met op de veel grotere groep prematuren van 28 weken en ouder, waarvan we weten dat hun ontwikkeling - na onvermijdelijke vroeggeboorte - bedreigd is. Het is echter niet ondenkbaar dat de resultaten die geboekt worden in het voorgestelde project, geëxtrapoleerd kunnen worden naar de extreem vroeggeborenen.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Onder C20 van uw advies noemt u dat een groot deel van de oaien gedood zal worden. De mate van ongerief dat deze dieren ondergaan zal hergebruik in de weg staan. U concludeert dat overleving van de oaien niet realistisch is. De CCD vindt deze conclusie geen recht doet aan de door de aanvrager aangedragen argumenten.</p> <p>U stelt onder E3 van uw advies een dilemma dat de resultaten van het onderzoek eventueel gebruikt kunnen worden voor het verleggen van de grens voor vroeggeboren kinderen. De CCD heeft dit dilemma besproken, maar ziet dit dilemma niet als scope van de Wet op dierproeven.</p>

### 4 Inhoudelijke beoordeling

#### 3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	----------------------------------------------

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>		
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	Ongerief: 96,0% Matig 4,0% Licht	

### 5 Samenvatting

#### 5.2 lid1



## 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan geen verdoving/pijnbestrijding toe te dienen bij de pasgeboren lammeren die geïntubeerd worden voor beademing op de intensive care unit in het kader van verfijning. De aanvrager geeft aan het dierenwelzijn te verbeteren door de dieren tijdens beademing niet te sederen (zie antwoord op vraag 31 DEC advies). 5.2 lid1

Een deel van de pasgeboren dieren zal tijdelijk individueel gehuisvest worden op de intensive care unit en wellicht na het uitvallen van groepsgenoten.

5.2 lid1. Het individueel huisvesten van de dieren ontbreekt in de ongeriefinschatting in de bijlage dierproeven. De aanvrager is gevraagd om het bijkomende ongerief mee te nemen in de ongeriefinschatting.

De aanvrager geeft aan de dieren die op natuurlijke wijze zullen bevallen van controledieren ter adoptie te zullen aanbieden. 5.2 lid1

De DEC stelt als dilemma dat het onderzoek wellicht zou kunnen bijdragen aan het verleggen van de grens voor het in leven kunnen houden van veel te vroeg geboren kinderen. De onderzoeker heeft aangegeven dat het verleggen van deze grens geen onderdeel uitmaakt van het onderzoek, maar dat resultaten eventueel wel geëxtrapoleerd kunnen worden naar extreem vroeggeborenen. De DEC heeft aangegeven dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat onderzoek naar extreme vroeggeboorte geen onderdeel is van het onderhavige project.

De DEC geeft haar advies op basis van een meerderheidsstandpunt. Een DEC lid kan zich niet vinden in de onderbouwing dat het wegnemen van de lammeren bij de moederdieren een confounder kan zijn voor de ontwikkeling van deze dieren. 5.2 lid1. De aanvrager is gevraagd data aan te leveren voor dit standpunt.

## 6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

### 5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## 7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Naam van het project	Stamceltherapie voor de behandeling van hersenschade bij te vroeg geboren baby's
NTS-identificatiecode	NTS-NL-276520 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202215869
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Vroeggeboorte Stem cellen Hersenschade
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Van alle kinderen in Nederland wordt ongeveer 7% te vroeg geboren. Er is sprake van vroeggeboorte indien de zwangerschap korter duurt dan 37 weken. Naast de onvolledige ontwikkeling van organen ten gevolge van de vroeggeboorte, dragen vruchtwaterinfecties ook direct bij aan een verstoorde orgaanontwikkeling waaronder het brein bij het ongeboren kind. Daarnaast zijn de longen van vroeggeboren baby's vaak onrijp waardoor de ademhaling na de geboorte ondersteund moet worden op een Neonatale Intensive Care Unit. Echter, ondanks dat ondersteuning van de ademhaling door middel van mechanische ventilatie levensreddend is, kan bijdragen aan blijvende schade aan de hersenen van deze kinderen.</p> <p>In dit project wordt onderzocht in een schapenmodel of deze ontwikkelingsachterstand behandeld kan worden met behulp van stamcellen. De stamcellen die in dit project worden getest hebben twee belangrijke eigenschappen: (1) ze kunnen ontstekingsreacties die ten grondslag liggen aan hersenschade bij vroeggeborenen remmen; en (2) ze kunnen het lichaamseigen weefselherstel bevorderen. Gebruik makende van deze twee eigenschappen, zullen wij zullen onderzoeken welke toedieningsroute van stamcellen; zijnde in de bloedbaan of door middel van neusdruppels het beste werkt op specifieke momenten in het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen. Wij verwachten dat toediening via de bloedbaan namelijk meer ontstekingsremmend zal werken en dat toediening van via neusdruppels zal meer weefselherstellend zal zijn. Ook zullen wij de effecten onderzoeken van een combinatie van de twee toedieningsroutes. Naast het testen van verschillende toedieningsroutes op verschillende tijdstippen in het ziekteproces, zullen wij de toegediende cellen opvolgen om inzicht te krijgen waar ze in het lichaam naar toe gaan, hoe lang ze in het lichaam blijven en hoe ze exact werken.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op	<p>Dit onderzoek levert inzichten op over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan het brein na vroeggeboorte. Naast onderzoek van het brein zullen in dit onderzoek ook gegevens worden verzameld van andere orgaansystemen. We verwachten meer inzichten te verkrijgen in het ontstaan van schade van meerdere organen bij vroeggeborenen, leidend tot meer gerichte aanknopingspunten voor aanvullende behandelingen.</p>

lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

## VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

De schapen zullen een operatieve ingreep onder algehele narcose ondergaan. Tijdens deze operatie zullen katheters worden geplaatst in de bloedvaten van de foetus. In een later stadium zal een vruchtwaterinfectie worden opgewekt door middel van een injectie van een bacterieel bestanddeel in het vruchtwater via een katheter die tijdens de bovengenoemde operatie is geplaatst. Het lam zal middels een keizersnede onder algehele narcose worden geboren. Tijdens de keizersnede zullen extra infusen worden geplaatst en een buisje in de keel worden geplaatst waardoor het lam op de intensive care kunstmatig beademd wordt. Op de intensive care zal het lam naast kunstmatige beademing, medicatie toegediend krijgen via de aangelegde infusen. De lammeren (zowel vroeggeboren als voldragen) die opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen tweemaal onder algehele narcose een MRI scan ondergaan. Tevens zal bij de lammeren maandelijks een bloedafname worden gedaan.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

“De schapen zullen een operatieve ingreep ondergaan die kan leiden tot wondpijn. Een infectie in het vruchtwater kan fysiek ongerief voor de foetus veroorzaken. Echter, tijdens de zwangerschap is het bewustzijnsniveau van de foetus gering, waardoor dit ongerief niet als dusdanig ervaren zal worden. De ooien zullen, evenals de mens, geen symptomen of ongerief ondervinden van een vruchtwaterinfectie. De ooien zullen een keizersnede ondergaan onder algehele narcose. De lammeren worden na de vroeggeboorte verzorgd op een neonatale intensive care unit en zullen kunstmatig beademd worden. Deze kunstmatige beademing is noodzakelijk voor de overlevingskansen van de lammeren, maar speelt ook een cruciale rol bij het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen. Kunstmatige beademing Dit kan leiden tot ongerief in de vorm van pijn en benauwdheid. Door adequate pijnstilling en ventilatie strategieën uitgevoerd door getraind personeel zal dit tot een minimum beperkt blijven. Een gedeelte van de lammeren zal na beëindiging van de kunstmatige beademing worden gedood ten behoeve van laboratoriumanalyse van de korte termijneffecten van de stamcelbehandeling. Een tweede gedeelte van de vroeggeboren schapen zal na beëindiging van de kunstmatige beademing opgroeien tot volwassen leeftijd om de lange termijneffecten van de stamcel therapie te onderzoeken. Gedurende deze periode waarin de lammeren opgroeien tot volwassen leeftijd, zullen deze lammeren onder algehele narcose een MRI-scan ondergaan van het brein. Aan het einde van de lange termijnoverleving zullen ook deze lammeren worden gedood ten behoeve van laboratoriumanalyses die alleen plaats kunnen vinden op postmortaal verkregen weefsels. Deze lange termijneffecten zullen worden vergeleken met een groep à terme lammeren die spontaan zijn geboren. Deze lammeren dienen referentiewaarde te krijgen hoe de orgaanontwikkeling in de meest gunstige omstandigheden verloopt.”

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	304	0	12	292	0

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd
Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	12

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Na de experimentele procedure zullen de ooien en de lammeren op humane wijze worden gedood om weefsels voor verder laboratoriumonderzoek te verkrijgen. Een deel van de ooien zal natuurlijk bevallen van een lam. Deze ooien zullen na afloop van het experiment ter adoptie worden aangeboden.

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

In het huidige experiment bootsen we de klinische situatie na van een vruchtwaterinfectie (chorioamnionitis), vroeggeboorte en zorg voor vroeggeborenen op een intensive care. Al deze elementen dragen bij aan het ontstaan van hersenschade bij vroeggeborenen en dit ziekteproces, waarin een groot aantal orgaansystemen betrokken zijn, proces kan nog niet nagebootst worden middels proefdiervrije alternatieven of knaagdieren. Belangrijk is dat we gebruik maken van weefsels van schapen die postmortaal verkregen zijn en weefsel van mensen die tijdens de operatie zijn verkregen om onderzoeksvragen te beantwoorden die in eerste instantie aanvullende dierproeven zouden vereisen.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Door ruime ervaring met schapen en het verzorgen van lammeren op de lammeren intensive care unit zijn wij in staat om uitval te beperken. Onze experimenten worden uitgevoerd door zeer ervaren personeel volgens gevestigde protocollen. Deze methoden zijn in het voordeel van reproduceerbaarheid en gebruik van eerder verkregen historische gegevens en voorkomen onnodig gebruik en verlies van dieren. Bovendien maken we geen onderscheid tussen geslacht, aangezien onze klinische populatie uit beide geslachten bestaat. Door gebruik te maken van niet-invasieve technieken zoals MRI-scans, kunnen we de hersenontwikkeling herhaaldelijk in één enkel dier bestuderen zonder dat een dier hiervoor zal komen te overlijden. Hierdoor kunnen wetenschappelijke inzichten vaker en met minder dieren verworven worden. Door de voorgestelde experimenten om de stamcellen op te volgen uit te voeren in dezelfde dieren als nodig zijn voor de voorgestelde korte termijn experimenten, kunnen we het aantal benodigde dieren verminderen.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Ooi:  
We hebben de huisvesting na de operatie voor de ooiën aangepast van individuele huisvesting naar groepshuisvesting. Dit heeft geleid tot minder postoperatieve complicaties, waaronder infectie, een verbeterde werking van het maag-darm-stelsel, en minder overlijden van de foetus. Bovendien heeft groepshuisvesting het welzijn van de ooiën verbeterd, aangezien deze omstandigheden natuurlijk gedrag mogelijk maken. Onze experimenten zullen worden uitgevoerd door hoog opgeleid personeel dat is opgeleid om klinische verschijnselen, zoals in spontane weeën en vroeggeboorte, te herkennen en erop te reageren. Erkenning van spontane bevalling verkleint de kans op complicaties en verbetert het dierenwelzijn.

Lammeren:  
Tijdens kunstmatige beademing zullen de lammeren in een hangmat worden geplaatst. Deze hangmat maakt het mogelijk voor het lam om te bewegen, waardoor de bloeddruk bloeddruk op peil gehouden kan worden en de gevolgen van bloeddrukschommelingen voorkomen voorkomen kunnen worden. Bovendien zal de aanwezigheid van een zuigreflex de peristaltiek mogelijk maken en daardoor voeding met moedermelk mogelijk maken, wat essentieel is voor de overleving en het welzijn van het pasgeboren lammetje. We houden alle lammeren zoveel mogelijk in groepen om te zorgen voor natuurlijker gedrag, minder stress en minder focus op en afhankelijkheid van de mens. de experimenten op de intensive care voor vroeggeboren lammeren worden uitgevoerd door hoog opgeleid personeel zoals klinische professionals (neonatologen en verpleegkundigen) die normaliter werkzaam zijn op de Neonatale Intensive Care. Dit heeft geresulteerd in een verminderd aantal infecties en een verhoogde neonatale overleving.

Licht de keuze van de soorten

De keuze van het diermodel is gebaseerd op de lichaamsgrootte, gebruik van vergelijkbare

en de bijbehorende levensstadia toe

apparatuur als op de neonatale intensive care en grote overeenkomsten in de ontwikkelingsbiologie tussen mensen en schapen. Hierdoor kunnen bevindingen in ons diermodel kunnen eenvoudig worden vertaald naar de klinische praktijk. De leeftijd van de foetus is gekozen omdat dit een overeenstemming is met de hersenontwikkeling en de longontwikkeling van de grootste groep vroeggeborenen in het ziekenhuis.



**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

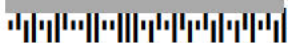
**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	01-03-2022
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	28-02-2027
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h  
5.1 lid2e  
5.1 lid2h



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD **5.1 lid2h** 202215869  
**Bijlagen**  
3

Datum 8 april 2022  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **5.1 lid2e**

Op 17 februari 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity " met aanvraagnummer AVD **5.1 lid2h** 202215869. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 9 april 2022 tot en met 28 februari 2027.

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

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de **5.1 lid2h** (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 maart 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 1 april 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op onderbouwing verschillende groepen vroeggeboren dieren en het benoemen van het doden van de dieren in de NTS, het benoemen van individuele huisvesting van de dieren in de bijlage dierproeven en het onderbouwen van een confounder van het moederloos opgroeien van de dieren in het projectvoorstel. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**

8 april 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD 5:1 lid2n 202215869

### **Overwegingen**

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

### **Bezwaar**

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

8 april 2022

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2h** 202215869

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**5.1 lid2h**

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 9 april 2022 tot en met 28 februari 2027, voor het project "Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity " met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202215869, na advies van <sup>5.1 lid2h</sup>. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is <sup>5.1 lid2e</sup>. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 17 februari 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 4 april 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival, zoals ontvangen op 4 april 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 4 april 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 maart 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 4 april 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Perinatal inflammation with postnatal survival</b>			
	Schape (Ovis aries)	304	96,0% Matig 4,0% Licht

### Geldende voorschriften

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

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



**Aanvraagnummer:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 202215869

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**AVD 5.1 lid2f 202215869

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

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** dinsdag 12 april 2022 13:47  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202215869

Geachte 5.1 lid2h

Op 17-02-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Cell-based therapies for perinatal inflammatory-stress-induced Encephalopathy of Prematurity ' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215869.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op onderbouwing verschillende groepen vroeggeboren dieren en het benoemen van het doden van de dieren in de NTS, het benoemen van individuele huisvesting van de dieren in de bijlage dierproeven en het onderbouwen van een confounder van het moederloos opgroeien van de dieren in het projectvoorstel.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 8-4-2022.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Onder C20 van uw advies noemt u dat een groot deel van de ooien gedood zal worden. De mate van ongerief dat deze dieren ondergaan zal hergebruik in de weg staan. U concludeert dat overleving van de ooien niet realistisch is. De CCD vindt deze conclusie geen recht doet aan de door de aanvrager aangedragen argumenten.

U stelt onder E3 van uw advies een dilemma dat de resultaten van het onderzoek eventueel gebruikt kunnen worden voor het verleggen van de grens voor vroeggeboren kinderen. De CCD heeft dit dilemma besproken en begrijpt het standpunt van de DEC, maar ziet dit dilemma niet als scope van de Wet op dierproeven.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl