

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015239								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Mail aanvullende informatie DEC 1-10-2015				x		x	x	
11	Mail aanvullende informatie 2-10-2015				x		x	x	
12	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail terugkoppeling DEC 14-10-2015				x		x	x	

15 SEP. 2015



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Groteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Post-doctoral researcher</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Post-doctoral researcher		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Post-doctoral researcher																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 0 . 1 0 . 2 0 1 5
- Einddatum 1 0 . 1 0 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van magnesium in diabetes type 2
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00	Lege
<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input checked="" type="checkbox"/> DEC-advies, factuurinformatie


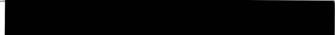
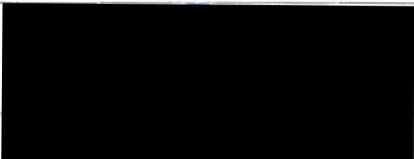
6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	
Functie	
Plaats	Nijmegen
Datum	10 - 09 - 2015
Handtekening	



**Form
Project proposal**

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes

2 Categories

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

Forensic enquiries

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Globally, over 400 million people suffer from diabetes mellitus, mainly type 2 (DM2). DM2 is characterized by the combined defect of insulin resistance and deficiency. Patients suffering from diabetes mellitus often show hypomagnesaemia (serum magnesium (Mg²⁺) concentration <0.7 mmol/L). In literature the incidence of hypomagnesaemia in DM2 patients is described as being between 13.5 and 47.7%, **compared to 2.5-15% in the general population, indicating the severity and importance of hypomagnesemia in this disease.**(1) **In our cohort from DM2 patients from the Radboudumc, hypomagnesemia is observed in 30% of the patients.** Dietary Mg supplementation for patients with DM2 improves glucose metabolism and insulin sensitivity.(2) Moreover, it has been shown that DM2 patients with reduced serum Mg concentrations show a more rapid decline in renal function.(3) Despite these promising results serum Mg²⁺ values are still not routinely measured, and restored in case of deficiency, in DM2 patients in the clinics.

An instrumental organ in Mg²⁺ homeostasis is the kidney, as it regulates and fine-tunes urinary Mg²⁺ loss via reabsorption processes. In the distal convoluted tubule (DCT), the final urinary Mg²⁺ concentration is determined and here Mg²⁺ reabsorption is mediated via the apical epithelial Mg²⁺-channel Transient Receptor Potential Melastatin 6 (TRPM6). Recent evidence, [REDACTED], indicates that insulin increases TRPM6 channel abundance and activity. (4) Two novel SNPs (p.Val1393Ile and Lys1584Glu) in *TRPM6*, resulting in an impaired response of TRPM6 to insulin, have been identified. (4)

Magnesium on the other hand plays a key role in the activation and intracellular signaling of the insulin receptor.

Rats on a low magnesium diet have increased blood glucose levels and reduced autophosphorylation of the beta-subunit of the insulin receptor.(5) **Moreover, in another study it was showed that diabetic rats receiving magnesium supplementation had increased insulin and GLUT-2 mRNA expression compared to control-fed counterparts. (6) The importance of magnesium as a regulator of diabetes is also underlined by the fact that low magnesium intake is correlated with the development of DM2, and that magnesium-supplementation has beneficial effects on the disease development and progress in several small cohort studies. (2,7-9)As magnesium has an effect on the development and progress of diabetes and diabetes itself can induce a hypomagnesemia,** low serum magnesium may be both a cause and consequence of DM2, however this still needs to be further elucidated. Due to the lack of understanding of the

underlying mechanisms, magnesium is largely neglected by clinicians. With this proposal we will aim to further elucidate the mechanism underlying the effects of hypomagnesaemia in DM2 and raise awareness among clinicians for the importance of this ion in DM2.

A pilot experiment has already been initiated in which three different low-magnesium diets are given to mice for a period of 16 weeks ([REDACTED] [REDACTED]). This pilot will provide us with initial data about the optimal magnesium-concentration in the diet, side-effects of the diet and preliminary data regarding diabetes and ion homeostasis.

Besides hypomagnesaemia, also other electrolyte imbalances are observed in DM2 patients, namely in potassium, sodium, calcium and phosphate (10). Mainly potassium is an interesting ion in the scope of DM2 as it has been shown that low serum potassium is indicated with reduced insulin secretion, impaired glucose tolerance and reduced peripheral glucose uptake in tissues. Low potassium and low magnesium often coincide in diseases (such as Gitelman or Barter syndrome), due to the fact that low intracellular magnesium activates the potassium channel ROMK, resulting in increased renal excretion of potassium (11).

Hypokalaemia can occur in DM2 patients by exogenous insulin (which increases the uptake of potassium in muscle cells), by intestinal malabsorption or by a renal potassium leak.

1. Pham, P.C., et al., Hypomagnesemia in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007. 2(2): p. 366-73.
2. Rodriguez-Moran, M. and F. Guerrero-Romero, Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects: a randomized double-blind controlled trial. *Diabetes Care*, 2003. 26(4): p. 1147-52.
3. Pham, P.C., et al., Lower serum magnesium levels are associated with more rapid decline of renal function in patients with diabetes mellitus type 2. *Clin Nephrol*, 2005. 63(6): p. 429-36.
4. Nair, A.V., et al., Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(28): p. 11324-9.
5. Suarez, A., et al., Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats. *Diabetologia*, 1995. 38(11): p. 1262-70.
6. Balon, T.W., et al., Magnesium supplementation reduces development of diabetes in a rat model of spontaneous NIDDM. *Am J Physiol*, 1995. 269(4 Pt 1): p. E745-52
7. Dong, J.Y., et al., Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Care*, 2011. 34(9): p. 2116-22.
8. Hruby, A., et al., Higher magnesium intake reduces risk of impaired glucose and insulin metabolism and progression from prediabetes to diabetes in middle-aged americans. *Diabetes Care*, 2014. 37(2): p. 419-27.
9. Song, Y., et al., Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 2004. 27(1): p. 59-65.
10. Liamis, G., et al., Diabetes mellitus and electrolyte disorders. *World J Clin Cases*, 2014. 2(10): p. 488-96.
11. Huang, C.L. and E. Kuo, Mechanism of hypokalemia in magnesium deficiency. *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(10): p. 2649-52

3.2 Purpose

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

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

The aim of this project is to gain more insight in the mechanism of the development of hypomagnesaemia in Diabetes Mellitus type 2 (DM2). Our research group has great expertise in the field of renal ion handling.

Our main goal of this project is to finally conclude whether low serum magnesium is a cause or consequence of DM2, or that both is the case. With the proposed experimental setup, we presume that after this study we will be able to make solid statements regarding this long-lasting debate. Moreover, by uncovering the molecular mechanism of hypomagnesaemia in DM2 we aim to increase awareness among clinicians to routinely measure magnesium and, if needed, give magnesium supplementation to DM2 patients.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

The cause of disturbances in serum magnesium, but also other ions (K⁺, Na⁺, Ca²⁺), in DM2 remains very poorly understood. Moreover, the effect that hypomagnesaemia has on the development and progression of DM2 on a molecular level remains to be elucidated. With this proposal we also aim to unveil the regulation of both magnesium and glucose homeostasis *in vivo*, resulting in invaluable knowledge in these fields.

Medical & Societal relevance

Diabetes affects approximately 400 million people worldwide and accounts for ± 15% of our health costs. Recent studies show that diabetes type 2 (DM2) patients with hypomagnesemia have a worse disease progression compared to their counterparts with normal serum magnesium levels. Despite this, magnesium is not routinely measured in DM2 patients in the clinic. By elucidating the mechanism by which hypomagnesaemia arises in DM2 patients we aim to increase awareness among clinicians to measure serum magnesium, and if needed, prescribe oral magnesium supplementation to DM2 patients. This could strongly reduce treatment costs and improve patient health in a simple and non-invasive manner

3.4 Research Strategy

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

- 1) We will start by testing the optimal magnesium concentration in a pilot experiment. [REDACTED]
In a subsequent experiment, mice will be subjected to either a normal or high-fat diet to induce obesity-induced diabetes. This diet will be combined with either a normal (**control**) or a low magnesium concentration (optimal concentration determined in the pilot experiment). The development and progress of the diabetes will then be monitored. Also the effect of diabetes on serum magnesium levels will be investigated.
- 2) In the second part of the study we want to investigate the effect of other dietary ion changes on diabetes development (diabetes model: high fat diet). The exact study setup is dependent on the results obtained in part 1, in which we looked at serum ion concentrations in diabetic mice. The concentration of ion in the diet will be determined by pilot experiments. Also, combined diets (e.g. high-fat + magnesium- and potassium-deficient diet) will possibly also be used. The effect of these diets on diabetes development and progress can then be more thoroughly investigated.
- 3) In the third part of the study we will use genetic mice models to study magnesium-homeostasis and the development of diabetes. By excising the pancreas post-mortem we can do ex-vivo stimulation studies on the Islets of Langerhans. Moreover, we can investigate differences in pancreas function between genetic mice on normal or magnesium-deficient diet. Depending on the results obtained in part 2, also other ions can be more thoroughly investigated.
We will use genetically modified mice as a model for diabetes in this part of the study, as these mice develop DM2 quicker and with less discomfort.
- 4) In the fourth part of the study we will again use diabetic mice (depending on the results from 1-3, this will be a high-fat or a genetic model). By intervening in the pathway involved in insulin signaling or magnesium-transport we want to investigate if we can influence the speed of diabetes development: speed it up, or slow it down; possibly partly rescuing the diabetes phenotype.

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

To elucidate the mechanism of hypomagnesaemia in Diabetes Mellitus type 2 (DM2) we will use four different approaches

- 1) A diet mouse model for low magnesium in the progression of diet-induced DM2. In this study we will combine a high-fat diet with magnesium-deficient diets.
Using this approach we will be able to determine the importance of magnesium on the development of DM2. Also this allows us to study in depth the effect that magnesium and high fat have on the expression of ion-channels in the kidney, the expression of glucose channels in soft tissues and the insulin/glucose sensitivity of tissues.
A pilot for this study, using three different magnesium-deficient diets, has already been initiated.
- 2) Diet mouse models using different dietary ion contents. For instance using potassium-deficient or potassium-enriched diets in combination with magnesium-diets. As it has been shown that normal potassium serum levels are required in order to restore low magnesium serum levels to normal. This can then also be combined with a high-fat diet to investigate the effect on the development of DM2. If no data is known about the concentrations/side effects of certain ion-diets, pilot experiments will first be conducted.

3) Studying the effect of magnesium in genetic DM2 mouse models, such as *db/db* or *ob/ob* mice. We want to also isolate beta-cells from the pancreas of these mice. We can then perform *in vitro* experimentation, for instance stimulation of these cells in the absence or presence of magnesium.

4) To determine the exact molecular mechanism of magnesium and DM2 we want to intervene in the intracellular pathway. This will be done by injecting substances that act as inhibitors on proteins that are involved in the intracellular cascade of glucose- and magnesium handling. Also, we can try to rescue these mice by intervening in the intracellular pathway. The exact study design will be dependent on the results obtained in point 1-3.

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

In part 1) of this study we aim to determine if low serum magnesium exacerbates the development and progression diabetes mellitus type 2 (DM2). Moreover, this study design enables us to investigate the effects on magnesium homeostasis resulting from the diabetes.

In part 2) of this study we go more deeply into the role of other ions (such as potassium and sodium) in the homeostasis of magnesium and in the development and progression of DM2. The exact combination of diets is partly dependent on the results obtained in part 1, in which we will determine effects on several ion-concentrations and ion-transporters. If no effects are observed (in part 1) on ion-levels or the expression of ion-transporters in the kidney, this part of the study will not be performed.

In part 3) of this study the effects of magnesium on the pancreas will be more thoroughly investigated using genetic diabetes mouse models. Depending on the results obtained in part 1 and 2, we will combine this genetic model with a magnesium-deficient diet. If part 1 and 2 contain mainly negative results, this extra diet intervention will not be performed.

In part 4) of this study we will use drug interventions by administering inhibitors to investigate the effects observed in part 1-3 on a more molecular level. Also we will use drug interventions to aim to rescue the mice.

The exact type of drug that will be used to target the intracellular insulinreceptor signaling cascade, or cascades involved in magnesium transport, will be decided by the results obtained in part 1-3.

Using these 4 strategies, we will elucidate the role of magnesium in DM2 from a molecular level to a translational level.

By clarifying the importance of magnesium in DM2 we hope to increase awareness among clinicians for the importance of this ion.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Magnesium deficiency in fat-induced DM2
2	Mouse models using different dietary ion contents
3	Magnesium deficiency in genetic DM2 models
4	Intervene in the intracellular cascade

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Magnesium deficiency in fat-induced DM2

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

To examine the effects of the magnesium availability on the development of DM2, we will feed adult mice a high-fat diet to mimic the onset of DM2 by a Western pattern diet and use normal fat concentrations as control groups. Diets will also be combined with either normal or low magnesium-concentrations to research the role of magnesium on the development and progress of DM2. [REDACTED]

Hence, the setup of diets might look like this:

- Normal fat + Low magnesium
- Normal fat + Normal magnesium
- High fat + Low magnesium
- High fat + Normal magnesium

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important parameter being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine magnesium concentrations. This will show us the severity of hypomagnesemia in these mice.

We will also determine the expression of magnesium transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Mice will be fed normal- or high-fat containing diets for a maximum period of 16 weeks, combined with different dietary magnesium concentrations. Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as markers of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time.

This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

To study the effects of magnesium on the development of diabetes, and to study the effects of diabetes on the development of hypomagnesemia, we expect to use approximately 100 mice. Namely, 2 studies involving 40-50 mice, in which four groups of approximately 10 mice per group will be used. Each group will be given a different diet (normal/high fat, low/normal magnesium).

We are currently already running a pilot experiment for this study (██████████), therefore no additional animals are required for pilot-experiments in this part.

Before starting the experiment a power calculation will be performed using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

We will make use of adult mice (*mus musculus*), often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research as it is sensitive for the development of diabetes by a high-fat diet. Mice will be ordered from commercial suppliers.

In total we will be using 100 mice for this part of the study. We will likely be using a setup of four different diets.

To study the effects of magnesium on the development of diabetes, and to study the effects of diabetes on the development of hypomagnesemia, we expect to use approximately 100 mice. Namely, 2 studies involving 40-50 mice, in which four groups of approximately 10 mice per group will be used. Each group will be given a different diet (normal/high fat, low/normal magnesium) resulting in the following groups:

- Normal fat, Low magnesium- Normal fat, Normal magnesium- High fat, Low magnesium- High fat, Normal magnesium

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	100	6-15 week old, adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. Pilot studies have been performed (██████████) that provide good data on variation and effect size of the proposed magnesium diets. If necessary because not all information is available, a pilot study will be performed. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

F. Accommodation and care

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Moreover, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or high fat content and normal or low magnesium concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

As anesthesia influences glucose metabolism, no anesthesia will be administered for the insulin and glucose tolerance tests

[] Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Mice may suffer from adverse effects of the dietary intervention.

A high-fat diet can cause an oily fur and increase scratching of the skin, which can potentially result in inflammation and dermatitis. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner. The mice develop severe obesity (body weight can reach up to 60-70 gram). Therefore cage density will have to be taken into consideration. Moreover, diabetic mice tend to have increased urine production, which requires more frequent cage changes and extra absorbent bedding. Mice might also have a reduced core body temperature, due to reduced thermogenesis, and cannot adapt well to reduced room temperature. After 16 weeks, mice might have stage 1 chronic kidney disease due to the diabetes.

Mice develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study (██████████), which is currently being performed. After 8 weeks, no side-effects have currently been observed.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting and glucose/insulin tolerance tests.

Explain why these effects may emerge.

- Obesity and Diabetes due to high-fat diet
- Possible muscle cramps/increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests
- Teeth problem due to the soft high-fat diet

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional biting-material will be added to the cages. Mice on high-fat diet will develop obesity and diabetes. They can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment
4. (Reliable and applicable) results can not be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Specific humane endpoints for magnesium-deficient diet: visible muscle cramps, lack of movement, not able to hold on to the cage
6. Specific humane endpoints for high-fat diet: complete movement impairment, dermatitis, respiratory depression
7. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician or researcher has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of endpoints by the magnesium-deficient diet is currently being investigated in a pilot experiment ([REDACTED]). Currently, the pilot is running for 8 weeks, where no adverse effects are observed in mice given a severe magnesium-deficient diet (0.02% magnesium). Therefore we expect the incidence of humane endpoints by magnesium-deficient diet to be <5%

The incidence of humane endpoints by a high-fat diet (usually by dermatitis) is approximately 5-10%, according to previous experiments using high-fat diets performed in our group

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and 'double-diet': low ion + high fat)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Mouse models using different dietary ion contents

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

It has been shown that patients with Diabetes Mellitus type 2 (DM2) have decreased serum magnesium levels which results in a worse disease progression compared to normomagnesemic DM2 patients. Also other electrolyte disbalances are observed in DM2 patients such as dysnatremia, dyskalemia, dyscalcemia and hypophosphatemia. It is known from other diseases that restoring a hypomagnesemia by oral magnesium supplementation requires a healthy serum potassium level. Moreover, potassium has its own potential effects on the development of diabetes. Hypokalemia is indicated with impaired insulin production and reduced peripheral glucose utilization by tissues. Also insulin could have an effect on potassium levels by increasing potassium uptake in skeletal muscle cells. However, the exact interplay between different ions (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) in diabetes disease development and progression remains to be elucidated.

To examine the effects of electrolyte availability on the development of DM2, we will feed adult mouse a high-fat diet to mimic the onset of DM2 by a Western pattern diet and use normal fat concentrations as control groups. Both fat diets will be contain different electrolyte contents (e.g. rich/deficient of potassium, rich/deficient in magnesium, rich/deficient in sodium or combinations of these) to establish the effect of magnesium on the development of DM2.

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated. The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium/potassium/sodium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine ion concentrations. This will show us the blood ion state of these mice. We will also determine the expression of ion transporters in the intestines and kidney. There is great expertise in our department regarding this part.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Mice will be fed with normal- or high-fat containing diets for a maximum period of 16 weeks, combined with different dietary electrolyte concentrations. Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail

vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as markers of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time.

This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The number of mice is based on a project duration of 5 years. Each individual experiment will include on average 40 mice to study diabetes (approximately 4 groups of 10 mice per study). Expectedly 4 experiments will be performed wherein different electrolytes will be investigated. Prior to these experiments, pilots will have to determine the optimal concentrations, and to investigate certain side-effects of the diet. For this we estimate to use 40 mice.

Therefore we need 200 mice for this part of the study.

Prior to any experiment a power calculation will be conducted using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

We will make use of adult mice (*mus musculus*), often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research as it is sensitive for the development of diabetes by a high-fat diet. Mice will be ordered from commercial suppliers.

Each individual experiment will include on average 40 mice to study diabetes (approximately 4 groups of 10 mice per study). Expectedly 4 experiments will be performed wherein different electrolytes will be investigated. Prior to these experiments, pilots will have to determine the optimal concentrations, and to investigate certain side-effects of the diet. For this we estimate to use 40 mice. Therefore we need 200 mice for this part of the study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	200	6-15 week old adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. Pilot studies have performed () that provide good data on variation and effect size, for different electrolytes a literature search will be performed to obtain information on expected variation and effect size. If necessary, because not all information is available, a pilot study will be performed. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Moreover, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or high fat content and normal or low ion concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

H. Pain and pain relief

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

No anesthesia will be used for glucose/insulin tolerance tests as this influences glucose metabolism

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Mice may suffer from adverse effects of the dietary intervention.

A high-fat diet can cause an oily fur and increase scratching of the skin, which can potentially result in inflammation and dermatitis. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner. The mice develop severe obesity (body weight can reach up to 60-70 gram). Therefore cage density will have to be taken into consideration. Moreover, diabetic mice tend to have increased urine production, which requires more frequent cage changes and extra absorbent bedding. Mice might also have a reduced core body temperature, due to reduced thermogenesis, and cannot adapt well to reduced room temperature. After 16 weeks, mice might have stage 1 chronic kidney disease due to the diabetes.

Mice develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study, which is currently being performed.

A potassium-deficient diet can induce arrhythmia's, muscle weakness, tremor, muscle cramps and constipation. Literature search and potentially a pilot-experiment will have to determine the appropriate concentration of potassium in the diet.

No effects are expected from a potassium-enriched diet, as the concentration potassium in standard chow is already high. Side effects could include muscle weakness and sudden cardiac death.

Also no severe effects are expected in a low sodium diet. A high sodium diet could result in cardiovascular problems.

Before using any of these diets, thorough literature search and a potential pilot experiment will determine the optimal concentration and potential side-effects.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting and glucose/insulin tolerance tests

Explain why these effects may emerge.

- Obesity and Diabetes due to high-fat diet
- Possible muscle cramps/weakness and increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Possible arrhythmia's, constipation, muscle weakness and muscle cramps due to potassium-deficient diet.
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests
- Teeth problem due to the soft high-fat diet

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are solitary housed. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages. Mice on high-fat diet will develop obesity and diabetes. They can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available.

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians.

Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment
4. (Reliable and applicable) results can not be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Specific humane endpoints for ion-deficient diets: visible muscle cramps, lack of movement, not able to hold on to the cage, complete constipation.

6. Specific humane endpoints for high-fat diet: complete movement impairment, dermatitis, respiratory depression

7. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician or researcher has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of endpoints by the magnesium-deficient diet is currently being investigated in a pilot experiment ([REDACTED]). Currently, the pilot is running for 8 weeks, where no adverse effects are observed in mice given a severe magnesium-deficient diet (0.02% magnesium). Therefore we expect the incidence of humane endpoints by magnesium-deficient diet to be <5%

The incidence of endpoints by the potassium-deficient/enriched diets will be investigated by literature search and possibly a pilot study.

The incidence of humane endpoints by a high-fat diet (usually by dermatitis) is approximately 5-10%, according to previous experiments using high-fat diets performed in our group

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and 'double-diet': low ion(s) + high fat)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Magnesium deficiency in genetic DM2 models

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

In this part of the study we want to investigate the role of magnesium in DM2 using a well established genetic diabetes mouse model. By putting the diabetic mice on standard or magnesium-deficient diets, we can determine the role of magnesium in the development of diabetes. Additionally, we will remove the pancreas of these mice (after sacrifice) to isolate the islets of Langerhans. These islets will then be used for *in vitro* assays such as stimulation in the presence or absence of magnesium. Also we can investigate if the pancreas of the diabetic mice on a hypomagnesemic diet responds different to stimulation compared to the pancreas of diabetic mice on normomagnesemic diet. In this part of the study, in which we will look specifically at the pancreas, it might not be needed to mimic exactly the development of diabetes as seen in humans (high-fat diet). Therefore we may use genetic mouse models for diabetes, which have less discomfort compared to high-fat diet mice. The discomfort in these mice is lower compared to high-fat diet mice as no soft high-fat chow is required (no teeth problems) and the genetically modified mice do not develop an oily skin (leading to dermatitis). Also the mice develop diabetes more quickly compared to the high-fat diet.

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine magnesium concentrations. This will show us the severity of hypomagnesemia in these mice.

We will also determine the expression of magnesium transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

Another important parameter in this part of the study is ex-vivo stimulation of pancreas under different magnesium-concentrations.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

To investigate the role of magnesium in the Diabetes Mellitus type 2 (DM2) we will use a genetic mouse model of diabetes (e.g. *ob/ob* , *db/db* or others). The main focus of this part of the study is the pancreas.

To study the effects of magnesium on the pancreas of diabetic mice we will use different dietary magnesium concentrations.

Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as marker of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time. This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

Another genetic model that will possibly be used is the genetically modified Kir6.2-V59M mice, which express an inducible, beta-cell specific Kir6.2-V59M mutation. These mice are normal until they are induced (by tamoxifen injection), which we will do at the age of 8-15 weeks. A few days after tamoxifen injection they develop blood glucose levels of ~25 mM. Mice are normally kept diabetic for no more than 5 weeks and during this period no loss of condition is observed. This inducible model can be used to investigate effects after the diabetes has already been fully developed.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The number of mice is based on a project duration of 5 years. To investigate the role of magnesium in genetic diabetes models and to determine the effects of magnesium on the pancreas of these mice we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice), in a total of 3 experiments. An extra of 30 mice will be used for pilot experiments. (testing diet on genetic diabetes models or training the procedure of pancreas-excision in obese mice)

Therefore a total of 150 mice is required for this part of the study.

Before starting the experiment a power calculation will be performed using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

To determine the effects of magnesium on the progression of diabetes, and to investigate the effects magnesium has on insulin secretion by the pancreas' islets we will use mice which are genetically modified to develop diabetes. For these experiments we will use a well-established model in the field of diabetes, such as db/db, ob/ob, Kir6.2-V49M mice. Before the start of the experiments, the exact genetic mouse model will be chosen based on the particular needs of this experiment. For all of these strains we have access to blood samples, that will allow us to determine basal magnesium concentrations which will be instrumental in the final choice of the genetic model.

Which model will be used is dependent on currently running *in vitro* analyses on samples of these mice as well as more in depth literature search.

If we want to make use of non-genetically modified mice, we will use mice of C57bl/6 background making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research.

To investigate the role of magnesium in genetic diabetes models and to determine the effects of magnesium on the pancreas of these mice we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice), in a total of 3 experiments. An extra of 30 mice will be used for pilot experiments. (testing diet on genetic diabetes models or training the procedure of pancreas-excision in obese mice). Therefore a total of 150 mice is required for this part of the study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	150	6-15 week old, adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. Pilot studies have been performed () that provide good data on variation and effect size of the proposed magnesium diets. If necessary because not all information is available, a pilot study will be performed. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians. Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired. When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels. When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Possibly, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or low magnesium concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

No anesthesia will be used for glucose/insulin tolerance tests as this influences glucose metabolism

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

The main adverse effects on welfare of the genetic modification is the development of diabetes and involved side-effects hereof. The mice develop severe obesity (body weight can reach up to 60-70 gram). Therefore cage density will have to be taken into consideration. Moreover, diabetic mice tend to have increased urine production, which requires more frequent cage changes and extra absorbent bedding. *ob/ob* and *db/db* mice also have a reduced core body temperature, due to reduced thermogenesis, and cannot adapt well to reduced room temperature. Lastly, they may show weight loss and loss of condition as diabetes duration and hyperglycaemia increase.

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study, which is currently being performed ()

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting and glucose/insulin tolerance tests.

Explain why these effects may emerge.

- Obesity and Diabetes (and all of the side-effects hereof) due to genetic modification
- Possible muscle cramps/weakness and increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

The genetically modified mice will develop obesity and diabetes. They can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when

an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.

3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment
4. (Reliable and applicable) results can not be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Specific humane endpoints for magnesium-deficient diets: visible muscle cramps, lack of movement, not able to hold on to the cage
6. Specific humane endpoints for effects of genetic modification: complete movement impairment, respiratory depression
7. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician or researcher has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of endpoints by the magnesium-deficient diet is currently being investigated in a pilotexperiment ([REDACTED]). Currently, the pilot is running for 8 weeks, where no adverse effects are observed in mice given a severe magnesium-deficient diet (0.02% magnesium). Therefore we expect the incidence of humane endpoints by magnesium-deficient diet to be <5%

The incidence of humane endpoints by diabetes due to genetic modification is approximately <5%, according to literature

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and obesity+hypomagnesemia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure Intervene in the intracellular cascade

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

To more thoroughly investigate the exact mechanism of the interplay of magnesium and DM2 we want to inject substances which intervene in the insulin signaling pathways. Administration of inhibitors of proteins involved in the intracellular pathway of the insulin receptor will be used to examine the effect this has on the insulin signaling, severity of diabetes and magnesium homeostasis. Moreover, substances involved in the intracellular pathway of magnesium transporters will be tested.

These substances can be given to wildtype mice with or without a special diet (high fat/low magnesium/low potassium) or genetically modified mice; this is completely dependent on the results obtained in part 1-3 of this study.

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine magnesium concentrations. This will show us the severity of hypomagnesemia in these mice.

We will also determine the expression of magnesium transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

In this part of the study we will also study more in depth the effects on several proteins involved in the intracellular pathways involved in magnesium/insulin/glucose handling.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

To investigate the exact mechanism of the interplay of magnesium and Diabetes Mellitus type 2 (DM2) we will administer drugs that influence the intracellular insulin-receptor pathway, or pathways involved in magnesium homeostasis. The exact type of diabetes-model and type of drugs that will be used in these experiments is dependent on the results obtained in strategy 1 and 2.

Administration of drugs can be *via* the food, water, oral gavage or intraperitoneal injection. Optimal concentrations will be determined by literature research or, when this knowledge is insufficient, by a pilot study.

Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as marker of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time.

This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The number of mice is based on a project duration of 5 years. We expect to test at approximately 3 inhibitors in this part of the study. For each experiment we will use approximately 40 mice. Also pilot-experiments will be used to test effect and concentration of the drugs that will be used. This will require an additional 30 mice.

Therefore, we will need 150 mice for this part of the study.

Before starting the experiment a power calculation will be performed using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

We will make use of mice, often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research as it is sensitive for the development of diabetes by a high-fat diet.

Depending on the results obtained in experiment #3 we will also investigate these inhibitors on genetic diabetes mouse models. (*ob/ob* and/or *db/db* or others).

We expect to test at approximately 3 inhibitors in this part of the study. For each experiment we will use approximately 40 mice. Also pilot-experiments will be used to test effect and concentration of the drugs that will be used. This will require an additional 30 mice. Therefore, 150 mice are required for this part of the study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	150	6-15 week old adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*.

Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. The studies that have been described in parts 1 and 2 of the project proposal will be used to obtain reliable data on variation and effect size allowing good power calculations. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Moreover, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or high fat content and normal or low magnesium concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

H. Pain and pain relief

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

IP injection for insulin tolerance test, and possibly for administration of drugs is also not performed under anesthesia for the same aforementioned reason.

Moreover, no anesthesia will be used for glucose/insulin tolerance tests as this influences glucose metabolism

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Mice may suffer from adverse effects of the dietary intervention. The exact diet or combination of diets is dependent on the results obtained in part 1-3. Likely diets can include high-fat and magnesium-deficient.

A high-fat diet can cause an oily fur and increase scratching of the skin, which can potentially result in inflammation and dermatitis. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner.

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study, which is currently being performed.

Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional biting-material will be added to the cages

Mice may suffer from adverse effects from the inhibitors. In depth literature search and pilot experiments will have to determine the optimal dose, and potential side-effects that can arise. If drugs negatively regulate the intracellular downstream signaling pathway of the insulin receptor, possible side-effects could include development of (more severe) diabetes and ketoacidosis.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting, glucose/insulin tolerance tests, intraperitoneal injection and oral gavage.

Explain why these effects may emerge.

- Side-effects from the administration of inhibitors involved in insulin and magnesium handling
- Obesity and Diabetes due to high-fat diet
- Possible muscle cramps/increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests
- Teeth problem due to the soft high-fat diet
- Stress/pain from oral gavage/intraperitoneal drug administration

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages

Obese/diabetic mice can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like loosing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and 'double-diet': low magnesium + high fat)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0073
2. Titel van het project: The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes.
3. Titel van de NTS: De rol van magnesium in diabetes type 2.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 23-04-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-05-2015 tot 22-06-2015 en van 13-07-2015 tot 15-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-06-2015 en 15-07-2015
 - advies aan CCD: 07-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 18-05-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -3.2 Om het effect van magnesium-suppletie bij mensen met diabetes te kunnen onderzoeken is het niet noodzakelijk om vooraf dierexperimenten te doen. De onderzoekers worden verzocht dit preciezer te formuleren.
 - -4.1 De onderzoekers stellen dat er grote overeenkomsten zijn tussen muis en mens. Kunnen zij duidelijker uitleggen wat ze daarmee bedoelen?
 - **Project Proposal:**

- 3.1 Het projectvoorstel berust op een veronderstelde relatie tussen diabetes mellitus type 2 en hypomagnesiëmie. De onderzoekers schrijven dat mensen met diabetes vaak te weinig Mg²⁺ in hun bloed hebben. Kunnen zij aangeven hoe vaak? Wat is de incidentie, hoe groot is de groep met DM2 zonder hypomagnesiëmie? Uit een referentie uit 2003 blijkt dat Mg-suppletie een verbetering van het ziektebeeld teweeg kan brengen. Kunnen de onderzoekers uitleggen welk vervolgonderzoek er sindsdien is gedaan op basis van deze belangrijke resultaten, en welke conclusies daaruit zijn getrokken? Zijn er studies waar een dergelijk effect níét gevonden is? De commissie vindt het vreemd dat er de laatste 12 jaar kennelijk geen follow-up is geweest naar aanleiding van dergelijke veelbelovende resultaten. De onderzoekers stellen voorts dat het gebrek aan aandacht van klinici voor dit onderwerp wordt veroorzaakt doordat er geen kennis is over de onderliggende werkingsmechanismen. Gebrek aan kennis over het werkingsmechanisme is voor klinici doorgaans geen reden om een effectieve therapie niet toe te passen. In onderdeel 3.2 vermelden de onderzoekers dat er een long-lasting debate is over dit onderwerp. Een weergave van dit debate is op zijn plaats onder 3.1.

De onderzoekers willen ook de relatie van andere ionen met diabetes onderzoeken (onderdeel 3.3), maar dit wordt nergens beschreven in de gegeven achtergrond. De onderzoekers worden verzocht de interesse voor deze ionen hier toe te lichten en hun belang te onderbouwen.

- 3.2 De onderzoekers schrijven dat zij al eerder experimenten hebben gedaan met Mg-deficiënte of verrijkte diëten die een goede basis vormen voor toekomstige experimenten. De commissie mist de verwijzing naar deze experimenten in het onderdeel achtergrond.

- 3.4.1 onderdeel 3) De onderzoekers gebruiken genetisch gemodificeerde muizenmodellen voor diabetes. Wat is het magnesium-gehalte in het bloed van deze muizen? Vertonen zij hypomagnesiëmie? Waarom willen de onderzoekers de beta-cellen uit de pancreas van deze dieren in plaats van wildtype dieren in vitro onderzoeken?

- 3.4.1 onderdeel 4) Gaan de onderzoekers behalve het effect van medicijnen die ingrijpen op de intracellulaire pathways ook het effect van Mg-suppletie op het verloop van diabetes onderzoeken? In het algemeen vertonen de onderdelen 3.4.1 en 3.4.2 een grote mate van overlap. De commissie geeft de aanvragers in overweging 3.4.1 vooral te gebruiken voor het schetsen van het overall design (zonder te specifiek te worden).

- **Description of Animal Procedures:**

- DAP1-4, onderdeel B. De verantwoording voor de gevraagde aantallen dieren ontbreekt hier. De desbetreffende alinea uit onderdeel A, derde vraag kan hier toegevoegd worden ter verduidelijking.

Ook komen de aantallen in de tekst en in de tabel niet altijd overeen.

- DAP3, onderdeel A eerste vraag: Wat is de rationale voor het gebruik van het genetische model? Dit is onvoldoende onderbouwd. Leveren proeven met pancreasmateriaal van wt muizen geen bruikbare resultaten op?

- DAP3, onderdeel A tweede vraag: De onderzoekers zullen één genetisch muismodel kiezen uit ob/ob, db/db en anderen, waaronder het induceerbare model Kir6.2-V59M. Op grond waarvan wordt deze keuze gemaakt, en waarom is een genetische model noodzakelijk voor alle experimenten die in dit onderdeel zijn beschreven?

- Datum antwoord: 22-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

-3.2-Zoals gevraagd door de commissie, hebben we het belang van onze studie verduidelijkt in de niet-technische samenvatting. We willen graag benadrukken dat we met dit project niet het effect van magnesium als interventie strategie bij diabetes patiënten willen onderzoeken en we zijn het ermee eens dat dit direct in patiënten zou kunnen. Het doel van dit project is om het moleculaire mechanisme te begrijpen. Hiervoor moeten we organen onderzoeken, RNA uit weefsels kunnen halen en een strikt gecontroleerde omgeving creëren, dit zou niet mogelijk zijn in proefpersonen. Door gebruik te maken van muizen kunnen we de effecten van de voorgestelde diëten op de nieren bekijken. Het onderzoeken van moleculaire signalering en het bekijken van het samenspel van organen en hormonen is niet mogelijk in mensen of celweek.

-4.1-In muizen kan op dezelfde wijze diabetes type 2 ontstaan als in de mens (namelijk door een te hoge energieopname en te weinig beweging). In muizen zorgen we voor de ontwikkeling van diabetes type 2 door het gebruik van hoog vet diëten. Hierdoor kunnen we het ontstaan van diabetes in de muizen goed vergelijken met het ontstaan van diabetes in de mens. Ook zijn de hormonale regulaties waar wij geïnteresseerd in zijn, vergelijkbaar tussen de muis en mens. Verder zijn in de nieren van muizen voor het grootste deel dezelfde transporters en dezelfde feedbackloops aanwezig.

- **Project Proposal:**

-3.1-Volgens de literatuur ligt de prevalentie tussen de 13.5 en 47.7%. Dit zijn gigantische hoeveelheden patiënten (aangezien er 400 miljoen diabetespatiënten wereldwijd zijn). In ons eigen cohort van 401 DM2 patiënten () vinden wij een hypomagnesiëmie (serum $Mg^{2+} < 0.7$ mmol/L) in 30% van de patiënten. De groep DM2 patiënten zonder hypomagnesiëmie in ons cohort is derhalve 70%.

Er zijn meerdere cohortstudies uitgevoerd die positieve effecten laten zien van orale magnesium op het ziekteverloop van diabetes. Twee meta-analyses laten beide positieve effecten zien op verschillende diabetes-markers; (Dong, J.Y., et al., Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Care*, 2011. 34(9): p. 2116-22.) (Song, Y., et al., Effects of oral magnesium supplementation on glycaemic control in Type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized double-blind controlled trials. *Diabet Med*, 2006. 23(10): p. 1050-6.) Echter, in de kliniek worden serum-magnesiumwaarden nog steeds niet standaard bepaald en is het gebruik van magnesium als interventie nog steeds niet in gebruik. De belangrijkste reden hiervoor is dat de bestaande studies allen op relatief kleine patiëntengroepen zijn uitgevoerd. Het opzetten van een grootschalige double blind randomized controlled trial is lastig doordat er weinig interesse is vanuit de farmaceutische industrie omdat magnesium vrij verkrijgbaar is. Niettemin zijn er sinds het artikel uit 2003 verschillende cohort-onderzoeken en meta-analyses uitgevoerd. Er worden echter nauwelijks studies uitgevoerd die ingaan op de moleculaire pathways. Twee belangrijke recentere studies die hier wel naar keken zijn: Song, Y., et al., Common genetic variants of the ion channel transient receptor potential membrane melastatin 6 and 7 (TRPM6 and TRPM7), magnesium intake, and risk of type 2 diabetes in women. *BMC Med Genet*, 2009. 10: p. 4. Nair, A.V., et al., Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(28): p. 11324-9. ()

-DAP 1-4 onderdeel B: We hebben dit aangepast.

-DAP 3, onderdeel A eerste vraag- Zie antwoord op vraag bij 3.4.1 (Genetisch gemanipuleerde muizen als model voor diabetes zijn nuttig omdat deze in een veel kortere periode diabetes kunnen ontwikkelen vergeleken met het hoog-vet dieet model. Ook is het ongerief in deze muizen veel lager. Ze ontwikkelen geen vettige huid met bijkomende huidinfecties en hebben ook geen problemen met hun tanden (aangezien er geen zacht hoog-vet voedsel nodig is.) In dit onderdeel is het niet noodzakelijk om het effect van magnesium te bepalen op het ontstaan van diabetes zoals dat onderzocht wordt in deelonderwerp 1. In dit onderdeel wordt voornamelijk het effect van magnesium op de pancreas zelf bekeken. Effecten van magnesium op de pancreas van wildtype-muizen zal zeker ook onderzocht worden. Echter door de pancreas van diabetische muizen ex vivo te bestuderen worden ook de effecten van dit ziektebeeld op de pancreas meegenomen. Het weefsel van de pancreas van een diabeticus is in een zeer andere staat vergeleken met een 'normale' pancreas.

-DAP3, onderdeel A tweede vraag. De keuze wordt gemaakt op grond van literatuursearch en het analyseren van te verkrijgen samples van deze muizen (bepalen serum magnesium, expressie TRPM6 in nier). Waarom gebruik gemaakt wordt van een genetisch model is bij de bovengenoemde vraag beschreven. Het is echter niet zo dat in alle experimenten van dit onderdeel genetisch gemanipuleerde muizen worden gebruikt. Zoals hierboven ook is uitgelegd, zal namelijk ook gekeken worden naar effecten van magnesium op de pancreas van wildtype muizen (door dit ex vivo te bestuderen).

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 13-07-2015

- Strekking van de vragen:

- **Project Proposal:**

-3.1. Is de hypomagnesiëmie in de gewone niet-diabetische populatie hetzelfde als onder diabetici? Hoe aannemelijk is het dat de hypomagnesiëmie bijdraagt aan het ontstaan van de diabetes als 70% van de patiënten geen hypomagnesiëmie vertoont? En hoe relevant is binnen deze context de diabete muis zonder hypomagnesiëmie (3.4.1)? De onderzoekers worden verzocht deze informatie toe te voegen.

De gegeven antwoorden zijn niet allemaal verwerkt in de aanvraag. De commissie verzoekt de onderzoekers omwille van de leesbaarheid van het project voor de CCD de in de begeleidende brief gegeven informatie ook te verwerken in de projectaanvraag.

- Datum antwoord: 15-07-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Project Proposal:**

-3.1. De prevalentie van hypomagnesiëmie in de bevolking ligt tussen de 2,5% en 15%. De prevalentie van hypomagnesiëmie in diabetes mellitus type 2 (DM2) patiënten wordt geschat tussen de 13.5 en 47.7%. In ons cohort van diabetici ligt dit percentage op 30.5%. Dit is dus substantieel hoger dan de algemene bevolking. Het percentage hypomagnesiëmie in de normale bevolking is nu ook verwerkt in de achtergrond van de aanvraag.

-3.1. Er zijn meerdere publicaties die *in vitro* het effect van magnesium op insulineresistentie laten zien. Magnesium is een cofactor voor verschillende enzymen die betrokken zijn bij de activatie en intracellulaire signalering van de insuline receptor. In ratten op een laag

magnesiumdieet wordt een verminderde insuline expressie waargenomen. Ook is in ratten op een laag magnesiumdieet de fosforylatie van de insulinerceptor verminderd en hebben deze ratten een verhoogd glucose-niveau ten opzichte van ratten op een normaal dieet. Een ander belangrijk argument dat laat zien dat een hypomagnesiëmie kan bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van DM2, is het feit dat magnesiumsupplementatie een positief effect heeft op de insulinesensitiviteit en glucosewaarden in diabetici. Ook verlaagt magnesiumsupplementatie de kans op het ontwikkelen van DM2 in hoog risicogroepen. Deze uitleg is eveneens verwerkt in de achtergrond van de projectaanvraag met de bijbehorende referenties.

-3.4.1 De diabete muis zonder hypomagnesiëmie wordt gebruikt als controle voor de diabete muis met hypomagnesiëmie. Zo kunnen we kijken of het hebben van een hypomagnesiëmie zorgt voor een snellere en/of ernstigere ontwikkeling van DM2 t.o.v. een normomagnesiëmie. De diabete muis zonder hypomagnesiëmie is derhalve een essentiële controle voor dit experiment.

De genoemde systematische review en andere artikelen genoemd in de vorige brief zijn nu ook verwerkt in de achtergrond.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to gain more insight in the mechanism of the development of hypomagnesiëmie in Diabetes Mellitus type 2 (DM2).' en 'to finally conclude whether low serum magnesium is a cause or consequence of DM2, or that both is the case.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de invloed is van veel of weinig Magnesium, Kalium en Natrium of combinaties hiervan op het ontstaan en verloop van DM2 bij muizen, en welke moleculaire mechanismen betrokken zijn bij het verband tussen hypomagnesiëmie en DM2. Voorts zal duidelijk worden of een farmacotherapie gestoeld op deze kennis het ontstaan of het verloop van DM2 in muismodellen kan beïnvloeden. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën voor mensen met

DM2. Deze ziekte kent een hoge prevalentie in de bevolking. Hoewel de prevalentie van hypomagnesiëmie onder patiënten met DM2 significant hoger is dan die onder de normale gezonde populatie, zou de toch nog steeds relatief lage prevalentie van hypomagnesiëmie onder diabetici een reden kunnen zijn om af te zien van dit onderzoek. De commissie vindt echter dat er voldoende studies zijn die een positief effect van Mg-suppletie laten zien om dit onderzoek toch uit te voeren. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor DM2, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van veel of weinig Magnesium en andere ionen op het ontstaan en het verloop van DM2 bij muizen, en geeft meer inzicht in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is voor het merendeel van de handelingen realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gevolgen van de verschillende diëten die de muizen krijgen die leiden tot diabetes en ernstige obesitas (bij hoog vet dieet) of mogelijk leiden tot hartritme stoornissen en spierkrampen (bij laag Magnesium of laag Kalium dieet). De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames, het vasten, de glucose- en insulinetesten, de i.p. injecties in als licht. De commissie heeft zich gebogen over de inschaling van het ongerief veroorzaakt door de herhaalde solitaire huisvesting in metabole kooien gedurende 48 uur. In bijlage VIII van Richtlijn 2010/63/EU wordt kort verblijf in een metabole kooi (<24 uur) als voorbeeld van licht ongerief vermeld, wat impliceert dat een verblijf van 48 uur in een metabole kooi tot matig ongerief leidt. De onderzoekers schrijven in hun aanvraag dat een verblijf van 48 uur in een moderne metabole kooi licht ongerief voor de dieren veroorzaakt. Hoewel er tegenwoordig meer aandacht is voor het beperken van het ongerief voor dieren die in metabole kooien verblijven, is de commissie toch van oordeel dat een verblijf van 48 uur in een metabole kooi tot matig ongerief leidt. Op dit punt wijkt het oordeel van de commissie dus af van de inschaling van het ongerief in de aanvraag. Het ongerief als gevolg van de diëten schat de commissie in als matig, omdat de dieren hinder zullen ondervinden van de obesitas en diabetes (beide matige klinische abnormaliteiten zoals bedoeld in bijlage VIII van Richtlijn 2010/63/EU) die deze diëten veroorzaken. Op dit punt wijkt het oordeel van de commissie dus ook af van de inschaling van het ongerief in de aanvraag. De DEC is van mening dat de combinatie van al deze factoren tot maximaal matig ongerief leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een ziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze

aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 600 muizen.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Waar nodig wordt een pilot experiment gedaan om onbekende ernstige bijwerkingen zoveel mogelijk te voorkomen in het geplande experiment. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek kunnen belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven worden in het effect van de concentratie van magnesium en andere ionen op het ontstaan en het verloop van Diabetes type 2 (DM2) bij muizen, en in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn. De resultaten zullen onder andere een indicatie geven of deze inzichten aanleiding zijn voor het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën, zoals magnesiumsuppletie. Het belang van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de interactie tussen DM2 en de magnesiumhuishouding en het beschikbaar komen van nieuwe interventies acht de DEC substantieel, gezien de toenemende prevalentie van DM2 in de bevolking. De resultaten uit dit onderzoek kunnen op korte termijn vertaald worden naar klinische toepassingen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de gebruikte diëten in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015239

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015239. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 10 oktober 2015
Geplande einddatum: 10 oktober 2020
Titel project: The role of Magnesium in Type 2 Diabetes
Titel niet-technische samenvatting: De rol van magnesium in diabetes type 2
Naam DEC: RU Dec
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 september 2015



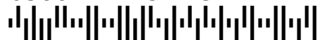
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015239

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015


Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 september 2015

Vervaldatum: 15 oktober 2015

Factuurnummer: 15700239

Ordernummer: 2015/0073 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015239	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 1 oktober 2015 8:59
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie op aanvraag AVD103002015239

Geachte [REDACTED]

De DEC heeft de onderzoekers niet gevraagd of zij van plan zijn beide geslachten of één geslacht te willen gebruiken. Ten tijde van de bespreking van dit project was nog niet duidelijk dat de CCD hier veel belang aan hecht. Ik heb de DEC nog niet gevraagd of zij graag een uitgebreide reactie wil geven op uw vraag. Dat zal ik zo meteen doen. Mocht die reactie inderdaad komen, dan zal ik deze naar u doorsturen.

Vriendelijke groeten,

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 28 september 2015 14:45
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie op aanvraag AVD103002015239

Geachte DEC leden,

Op 7 september 2015 heeft de RUDEC advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes', uw kenmerk: 2015-0073.

In de bijlages beschrijving dierproeven is het gebruik van muizen beschreven. Er wordt niet vermeld of er sprake is van beide geslachten of een geslacht. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Daarom zou de CCD graag willen weten of dit besproken is in de DEC vergadering.

Indien u deze informatie niet bekend is, zullen we na u reactie met de aanvrager contact opnemen met dezelfde vraag.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk woensdag, 30 september 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk bedankt voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical centre is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 2 oktober 2015 12:39
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015239
Bijlagen: Aangaande vraag van de CCD op DEC 2015-0073.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

Hierbij het antwoord van de onderzoekers op uw vraag. Als er verder nog onduidelijkheden zijn horen wij het graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum
Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
Geert Grooteplein 10 [REDACTED]
www.radboudumc.nl

Aanwezig: ma, wo en vr van 8.30 – 17.00 uur

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: donderdag 1 oktober 2015 9:33
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015239
Urgentie: Hoog

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 10 september 2015 hebben we uw aanvraag met aanvraagnummer AVD103002015239 voor het project 'The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes' ontvangen. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.


In de bijlages beschrijving dierproeven is het gebruik van muizen beschreven. Er wordt niet vermeld of er sprake is van beide geslachten of een geslacht. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is alleen dieren van een geslacht te gebruiken?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken. Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

U kunt de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op sturen, maar om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk vrijdag, 2 oktober 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,


Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....


T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



Geachte 

In reactie op uw mail van 1 Oktober 2015, aangaande het project met aanvraagnummer 'AVD103002015239', hebben wij hierbij toegevoegd het antwoord op de vraag in de desbetreffende mail.

We hopen dat we de vraag naar wens hebben beantwoord en dat de reden voor het gebruik van enkel mannelijke dieren in dit onderzoek verduidelijkt is.

Met vriendelijke groet,

A black redaction box covering the signature area at the bottom left of the page.

In het project getiteld 'De rol van magnesium in diabetes type 2' zal gebruik worden gemaakt van muizen om te bepalen of hypomagnesemie in diabetes mellitus type 2 een oorzaak of gevolg is van dit ziektebeeld. Om dit te onderzoeken zal in dit project slechts gebruik worden gemaakt van mannelijke muizen. Dit wordt gedaan om effecten van vrouwelijke hormonen uit te sluiten. Het is namelijk al sinds 1984 bekend dat oestrogeen-niveaus en magnesium homeostase aan elkaar gekoppeld zijn [1]. In vervolgstudies hebben ze eenzelfde correlatie laten zien tussen oestrogeen en magnesiumspiegels [2, 3]. Naar aanleiding van dergelijke publicaties is onze groep gaan uitzoeken wat het moleculaire mechanisme is dat ten grondslag ligt aan dit fenomeen. [REDACTED] dat oestrogeen een direct effect heeft op de magnesiumtransporteur 'TRPM6' in de nier [4]. Dit directe effect van oestrogeen op TRPM6 zorgt er dus voor dat oestrogeen de magnesiumhomeostase beïnvloedt. Om deze reden kunnen vrouwelijke dieren niet gebruikt worden in onze onderzoeken aangaande magnesiumhomeostase in diabetes mellitus type 2.

1. McNair, P., C. Christiansen, and I. Transbol, *Effect of menopause and estrogen substitutional therapy on magnesium metabolism*. Miner Electrolyte Metab, 1984. **10**(2): p. 84-7.
2. Seelig, M.S., *Interrelationship of magnesium and estrogen in cardiovascular and bone disorders, eclampsia, migraine and premenstrual syndrome*. J Am Coll Nutr, 1993. **12**(4): p. 442-58.
3. Muneyyirci-Delale, O., et al., *Serum ionized magnesium and calcium in women after menopause: inverse relation of estrogen with ionized magnesium*. Fertil Steril, 1999. **71**(5): p. 869-72.
4. Cao, G., et al., *Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA)*. J Biol Chem, 2009. **284**(22): p. 14788-95.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015239

14 OKT. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of Magnesium in Type 2 Diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015239. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "The role of Magnesium in Type 2 Diabetes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 oktober 2015 tot en met 10 oktober 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU Dec gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het advies wordt gevolgd en in aanvulling daarop zijn enkele algemene voorwaarden opgenomen. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.



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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.


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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 oktober 2015 tot en met 10 oktober 2020, voor het project "The role of Magnesium in Type 2 Diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015239, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU Dec.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 september 2015, ontvangen op 10 september 2015.



Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Magnesium deficiency in fat-induced DM2	Muizen (Mus musculus) / C57bl/6	100	Matig / moderate	
Mouse models using different dietary ion contents	Muizen (Mus musculus) / C57bl/6	200	Matig / moderate	
Magnesium deficiency in genetic DM2 models	Muizen (Mus musculus) / db/db, ob/ob, Kir6.2-V49M; C57bl/6	150	Matig / moderate	
Intervene in the intracellular cascade	Muizen (Mus musculus) / C57bl/6; ob/ob and/or db/db	150	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 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 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 blijven 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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 12:14
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit op aanvraag AVD103002015239

Geachte DEC leden,

Enige tijd geleden hebben wij een advies van u ontvangen betreffende aanvraag AVD103002015239, 'The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes'.

Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.