



16 NOV. 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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 / 313
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

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.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein	10
Postbus	9101, t.a.v. [Redacted]	
Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	Postdoctoraal onderzoeker,	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
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 2 _ 1 2 _ 2 0 1 5
- Einddatum 1 2 _ 1 2 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfal
- 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

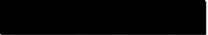
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

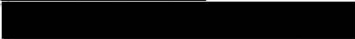
5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

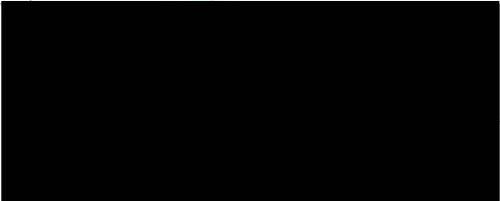
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende 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.

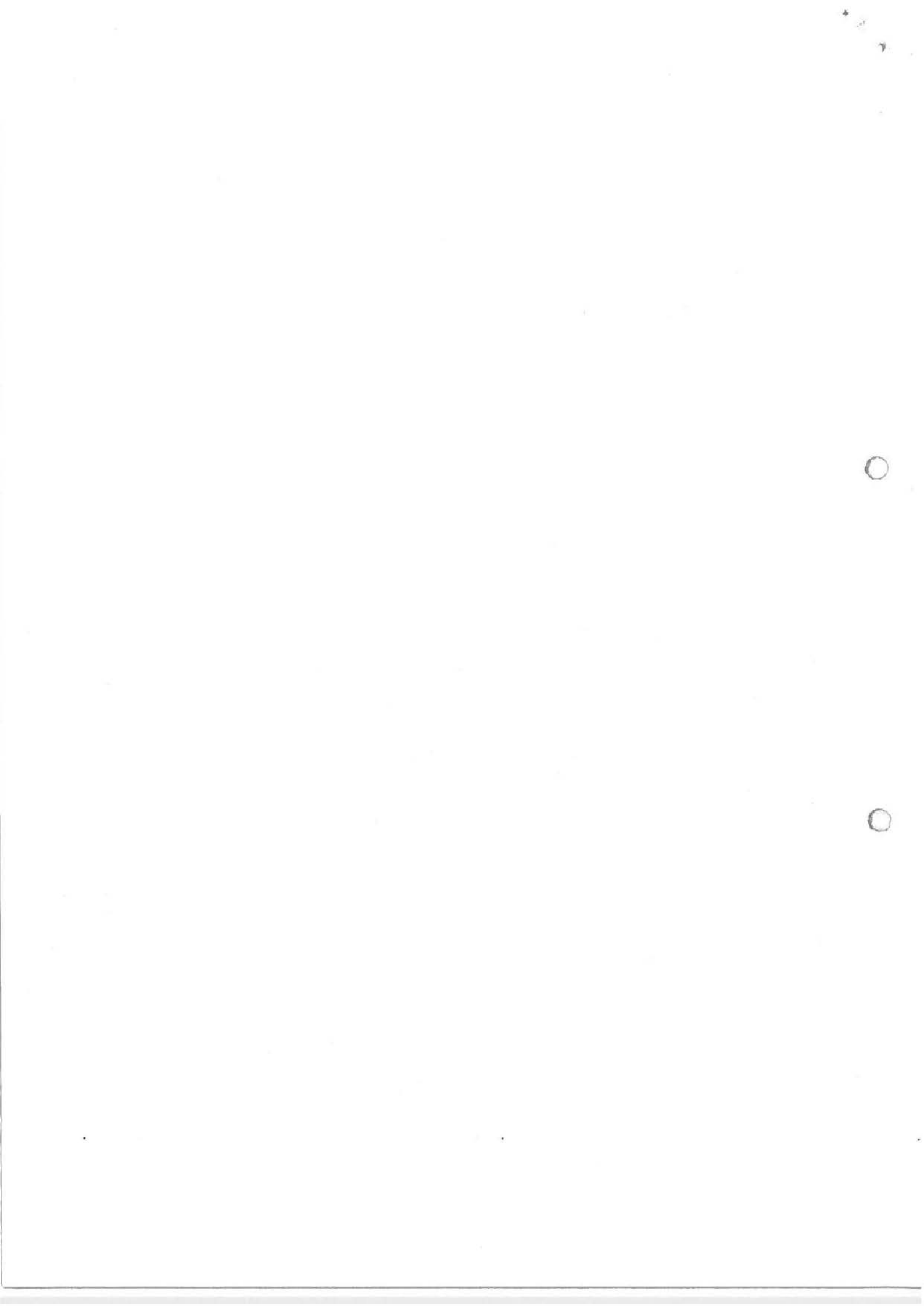
Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 13 - 11 - 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen? |

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 or 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.

Acuut nierfalen (acute kidney injury; AKI) is een frequent optredend probleem in gehospitaliseerde patiënten, en is geassocieerd met een verhoogde kans op het ontwikkelen van chronisch nierfalen en tevens geassocieerd met sterftcijfers van >50% (Murugan R *et al.* Nat Rev Nephrol 2011; Thadhani R *et al.* NEJM 1996; Singbartl K *et al.* Kidney Int 2012). De belangrijkste oorzaak van het ontwikkelen van AKI is bloedvergiftiging (sepsis) (Bagshaw SM *et al.* Clin J Am Soc Nephrol 2007). Bloedvergiftiging (sepsis) is te karakteriseren als een zeer sterke systemische ontstekingsreactie gericht tegen een infectie (pathogeen), welke gepaard gaat met het ontwikkelen van diverse complicaties, waaronder AKI. AKI als complicatie van sepsis is geassocieerd met kort- en lange-termijn risico op overlijden (Bagshaw SM *et al.* NDT 2008). Momenteel zijn therapeutische mogelijkheden voor de behandeling en/of preventie van sepsis-gemedieerd AKI zeer gelimiteerd, en slechts van ondersteunende aard. Het is daarom van cruciaal belang om meer inzicht te krijgen in de moleculaire en cellulaire patho-fysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van sepsis en sepsis-gemedieerd AKI, en therapeutische strategieën te ontwikkelen voor de behandeling van AKI in de septische patiënt.

Een van de primaire processen die optreedt tijdens sepsis(-gemedieerd AKI) is het ontwikkelen van heftige systemische en lokale nier ontstekingsprocessen (Bellomo R *et al.* Lancet 2012; Schrier RW *et al.* NEJM 2014; Chvojka J *et al.* Physiol Res 2010). **De focus van vele huidige klinische studies die ten doel hebben om sepsis te behandelen is dan ook gericht op het remmen van immuunactivatie (Savva A *et al.* Front Med 2013).** Het is bekend dat het aangeboren immuunsysteem een cruciale rol speelt in het opwekken van deze sterk overdreven immuunreacties (Leemans JC *et al.* Nat Rev Nephrol 2014; Gluba A *et al.* Nat Rev Nephrol 2010). Omdat een uit de hand gelopen immuunproces in de nier vervolgens leidt tot verergerende weefselschade en functiestoornissen is het cruciaal om meer inzicht te krijgen in de mechanismen waarmee ontstekingsreacties worden gereguleerd.

Het humaan cytokine Interleukine-37 (IL37) blijkt een krachtige remmende werking te hebben op de activatie van het aangeboren immuunsysteem. Daarnaast heeft IL37 ook een regulerende rol in de activatie van het adaptieve immuunsysteem (zoals activatie van dendritische cellen). In de mens komt IL37 in vele celtypen tot expressie, waaronder verschillende subtypen immuuncellen (zoals leukocyten en dendritische cellen) alsook in (nier) epitheliale cellen (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010). **Basale endogene expressie van IL37 is laag, en wordt pas sterk opgereguleerd door inflammatoire stimuli (Bufler P *et al.* Biochem J. 2004; Imaeda H *et al.* Clin Exp Immunol 2013).** De ontstekingsremmende werking van IL37 verloopt zowel via intracellulaire cascades **die de transcriptie van proinflammatoire genen remmen** (door 'endogene' IL37 expressie), als via exogeen IL37 wanneer dit eiwit aanwezig is in het extracellulaire milieu **(Bulau AM *et al.* PNAS 2014). Extracellulair IL37 kan zijn**

ontstekingsremmende werking uitvoeren door binding aan de alfa-keten van de IL18-receptor (IL18R), in samenwerking met de co-receptor IL1R8, maar fungeert niet als een klassieke antagonist voor deze receptor (Nold-Petry CA *et al.* Nat Immunol 2015; Li S *et al.* PNAS 2015).

Aangezien er bij de muis geen homoloog van humaan IL37 bekend is, wordt voor de bestudering van de rol van IL37 *in vivo* gebruik gemaakt van een muis welke transgeen gemaakt is voor humaan IL37 (hIL37tg). Deze hIL37tg muis brengt humaan IL37 constitutief in alle lichaamscellen tot expressie, en vormt zo de basis voor het huidige en reeds verrichte onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van IL37 (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010). **Ondanks dat IL37 expressie gekoppeld is aan de constitutief actieve CMV-promoter in alle transgene cellen, is de basale transcriptie laag en vindt er opregulering plaats door inflammatoire stimuli (Nold *et al.* Nat Imm 2010). Hierdoor komt de kinetiek van IL37 expressie in deze hIL37tg muis overeen met de humane situatie. Ook voor exogeen toegediend IL37 eiwit is er in een muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waaraan IL37 bindt) (Nold-Petry CA *et al.* Nat Immunol 2015).**

Ook voor het exogeen IL37 is er in de hIL37tg muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waarop exogeen IL37 functioneert). In verschillende experimentele modellen met behulp van de hIL37tg muis is gebleken dat IL37 een zeer krachtige anti-inflammatoire en beschermende functie heeft in diverse ziekteprocessen, waaronder colitis (McNamee EN *et al.* PNAS 2011), obesitas (Ballak DB *et al.* Nat Commun 2014), myocardiaal infarct (Wu B *et al.* Clin Exp Immunol 2014) en nier ischemie/reperfusie schade (Yang Y *et al.* Kidney Int 2014). Tevens is **met behulp van de hIL37tg muis** beschreven dat IL37 expressie een beschermende werking heeft tegen het optreden van LPS-geïnduceerde septische shock, welke leidt tot een sterke reductie van de systemische spiegels van diverse pro-inflammatoire cytokines en verminderde leverfunctiestoornissen (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010). In deze studie is echter niet gekeken naar de effecten van IL37 expressie op de lokale pathofysiologische consequenties van sepsis in de nier, en ook niet naar de effecten van IL37 op LPS-geïnduceerd AKI.

afkomstig van experimenten met primaire cellen () suggereren bovendien dat de aanwezigheid van zowel endogene IL37 expressie alsook exogene IL37 eiwit toediening een remmende werking geeft op de inflammatoire response van zowel immuuncellen alsook van nier epitheelcellen *in vitro*. Het is tot op heden echter onbekend wat de functionele contributie is van IL37 expressie in de onderliggende mechanismen van sepsis-gemedieerde AKI *in vivo*. Tevens is het nog onbekend of de toediening van exogeen IL37 eiwit mogelijk bescherming kan bieden tegen het ontwikkelen van sepsis-gemedieerd AKI. In deze studie willen we de therapeutische potentie van toegediend IL37 eiwit daarom vergelijken met de effecten van een ander component, welke reeds in experimentele studies een beschermend effect heeft laten zien tijdens sepsis-gemedieerd AKI. Uit verschillende experimentele dierstudies blijkt namelijk dat erythropoietin (EPO) een functionele bescherming biedt tegen het ontwikkelen van AKI tijdens sepsis (Coldewey SM *et al.* Kidney Int 2013; Aoshiba K *et al.* Crit Care Med 2009; Mitra A *et al.* NDT 2007).

De hypothese die wij in ons project hanteren is dat IL37 expressie een remmende en beschermende werking heeft op respectievelijk de ontstekingsprocessen en (nier)functiestoornissen die zich afspelen na het ontstaan van sepsis(-gemedieerd) AKI.

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?

Hoofddoelstelling: Het bestuderen van de functionele contributie en de therapeutische potentie van het ontstekingsremmend eiwit IL37 in sepsis-gemedieerd AKI.

Doelstelling Deelexperiment A: Het doel van de beschreven studie is het onderzoeken van de functionele contributie van IL37 expressie in de onderliggende mechanismen van sepsis-gemedieerd AKI.

Doelstelling Deelexperiment B: Hierin willen we de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening bestuderen tijdens sepsis-gemedieerd AKI, en deze effecten vergelijken ten opzichte van de beschermende werking van het eiwit erythropoietine (EPO). Deze component is in eerdere studies al aangetoond als beschermende factor tijdens sepsis-gemedieerde AKI (zie 3.1), en fungeert zodoende als positieve controle.

Voor de uitvoering van beide beschreven deelexperimenten is alle benodigde expertise en infrastructuur aanwezig op de afdeling [REDACTED]. Tevens worden de experimenten uitgevoerd in [REDACTED], waar alleen bevoegd en gecertificeerd personeel betrokken is bij de uitvoer van de betreffende handelingen. De gekozen proefopstelling is zodoende uitvoerbaar binnen de voorgenomen kaders.

3.3 Relevance

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

Acuut nierfalen is een frequent optredend probleem in gehospitaliseerde patiënten, en is geassocieerd met een verhoogde kans op het ontwikkelen van chronisch nierfalen en tevens geassocieerd met sterftcijfers van >50% (Murugan R *et al.* Nat Rev Nephrol 2011; Thadhani R *et al.* NEJM 1996; Singbartl K *et al.* Kidney Int 2012). De belangrijkste oorzaak van het ontwikkelen van AKI is sepsis (Bagshaw SM *et al.* Clin J Am Soc Nephrol 2007). AKI als complicatie van sepsis is geassocieerd met kort- en lange-termijn risico op overlijden (Bagshaw SM *et al.* NDT 2008). Het ontwikkelen van AKI tijdens sepsis verhoogt de mortaliteit, morbiditeit, en zorgt voor een verlengde opname duur op de ICU, gepaard gaande met sterk oplopende zorgkosten.

Ondanks veel onderzoek dat is verricht naar de mogelijke onderliggende mechanismen van het ontstaan van sepsis en sepsis-gemedieerd AKI, is de huidige behandeling slechts van ondersteunende aard, en zijn er nog geen therapeutische strategieën ontwikkeld welke tot de kliniek zijn doorgedrongen. Meer kennis is benodigd over de onderliggende mechanismen welke ten grondslag liggen aan de verstoorde immunologische reacties tijdens sepsis-gemedieerde AKI. Verbeterd inzicht in de rol van IL37 hierin opent mogelijkheden om AKI beter te behandelen.

3.4 Research Strategy

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

Dit project bestaat uit 2 hoofdlijnen:

Deelproject A: (beschrijvende studie): Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in "sepsis-gemedieerd AKI":

Om de exacte rol van endogene IL37 expressie in de pathofysiologie van sepsis-gemedieerde AKI te onderzoeken worden zowel wild type alsook hIL37tg muizen onderworpen aan een experimenteel model van "sepsis-gemedieerd AKI", door middel van een eenmalige sublethale intraperitoneale LPS injectie. Dit is in de literatuur het meest gangbare en gestandaardiseerde model wat wordt gebruikt om sepsis en daaropvolgend AKI te induceren. Tevens is de hIL37tg muis de enige muisoort die IL37 eiwit tot expressie brengt, en derhalve bruikbaar is om de rol van endogeen IL37 expressie te onderzoeken. Door het ziektebeloop en de onderliggende cellulaire en moleculaire processen in zowel nierweefsel alsook systemisch te bestuderen, en de resultaten tussen deze twee experimentele groepen met elkaar te vergelijken, kunnen we de functionele contributie van endogene IL37 expressie op verschillende tijdstippen van het ziektebeloop bestuderen.

Deelproject B: (Interventie studie): Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening tijdens "sepsis-gemedieerde AKI":

Om te bestuderen wat het therapeutische effect is van additioneel exogeen IL37 eiwit tijdens sepsis-gemedieerd AKI, en dit effect te vergelijken ten opzichte van een positieve controle (de therapeutische potentie van erythropoietine (EPO)), worden wild type muizen onderworpen aan een experimenteel model van "sepsis-gemedieerd AKI". Dit wordt uitgevoerd door middel van een eenmalige sublethale intraperitoneale LPS injectie, welke in de literatuur het meest gangbare en gestandaardiseerde model is om sepsis en daaropvolgend AKI te ontwikkelen. Muizen zullen daarna worden geïnjecteerd met exogeen recombinant IL37 eiwit, EPO, of vehicle als negatieve controle. De muizen worden op verschillende tijdstippen geofferd, om zodoende de werking van het toegediende IL37 en EPO te kunnen bestuderen in zowel bloed alsook lokale cellulaire en moleculaire processen in de nieren. De effecten van IL37 kunnen worden vergeleken met de resultaten behaald uit de groep muizen welke EPO kregen toegediend, om zodoende de mate van het effect te kunnen bepalen. De dosis van het toegediende IL37 eiwit en EPO worden bepaald aan de hand van studies beschreven in de literatuur.

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

In dit project wordt gestart met deelexperiment A (type 1 dierproef), waarin we de rol van endogene IL37 expressie in sepsis-gemedieerd AKI bestuderen. Met behulp van het bepalen van verschillende experimentele parameters (waaronder systemische cytokine/chemokine levels en leverfunctiewaarden) kunnen we tevens de reeds beschreven rol van IL37 in sepsis bevestigen (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010).

Dit wordt gevolgd door deelexperiment B, welke dient om de therapeutische potentie van IL37 toediening te bestuderen en te vergelijken ten opzichte van de therapeutische potentie van een reeds beschreven component, EPO (interventie studie).

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

Er zal worden begonnen met het uitvoeren van de experiment A, gevolgd door de experiment B. De resultaten uit de experiment A zullen niet de opzet van de experiment B beïnvloeden, aangezien in beide experimenten naar verschillende vormen van IL37 eiwit gekeken wordt (in de experiment A kijken we naar de rol van endogeen IL37 expressie; in de experiment B kijken we naar het effect van toegediend exogeen IL37 eiwit). **Uit een recente studie is gebleken dat endogene IL37 expressie een beschermend effect geeft op het ontwikkelen van sepsis (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Hierdoor is naar onze verwachting de experiment A optimaal om de werking van endogeen IL37 in het ontstaan van AKI als gevolg van sepsis te bestuderen. Extracellulair IL37 kan additieve effecten hebben bovenop de rol van endogeen IL37. Dit blijkt uit het feit dat het voorbehandelen van hIL37g muizen met IL37-blokkerende antilichamen een geneutraliseerd effect geeft na LPS toediening (Bulau AM et al. PNAS 2014).**

Het uitblijven van een eventueel therapeutisch effect van exogene IL37 toediening in de experiment B hoeft dus ook niet te betekenen dat er geen functie en/of rol is voor endogene IL37 expressie in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens sepsis (de experiment A). Wanneer er wel een effect gevonden wordt van endogene IL37 expressie (doel van de experiment A) kan dit namelijk aanleiding geven tot vervolgstudies waarin getracht wordt om het endogene expressie niveau van IL37 te moduleren, om zodoende bescherming te bieden tegen sepsis-gemedieerd AKI. Naar ons idee hoeven de resultaten van beide experimenten elkaar dus niet te blokkeren.

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	Deelexp. A: Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in sepsis-gemedieerd AKI
2	Deelexp. B: Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening gedurende sepsis-gemedieerd AKI

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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Deelexp. A: Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in sepsis-gemedieerd AKI

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.

Twee verschillende groepen muizen worden gebruikt: (a) C57BL/6J wild type (██████████) en (b) hIL37tg muizen (██████████). In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van geslacht (man) en leeftijd (8-12 weken oud) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

Ter inductie van sepsis ontvangen groepen WT en hIL37tg muizen een eenmalige intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS (component van de celwand van bacterien). Het ziektebeloop van de muizen en het ontstaan van AKI wordt vervolgens gemonitord. Groepen muizen worden geofferd op verschillende tijdstippen (2uur; 4uur; 24uur; 48uur) na de LPS injectie. Deze tijdstippen worden gekozen om zodoende de effecten van IL37 expressie in de acute inflammatoire processen (2uur en 4uur, voor bepalen van veranderingen in mRNA expressie niveaus), alsook de rol van IL37 expressie op latere momenten (24uur, 48uur, voor bepaling effecten op functioneel niveau) te onderzoeken. Als controle groep ontvangen een groep WT en hIL37tg muizen een eenmalige intraperitoneale injectie van vehicle (saline), waarna deze muizen op een eenmalig tijdstip worden geofferd (4uur). Deze groepen geven ons de basaal-waarden van allerlei te onderzoeken parameters (zie onder), en hierin wordt geen verschil tussen WT en hIL37tg muizen verwacht.

Alle muizen worden geofferd door cervicale dislocatie onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nieren, lever en miltweefsel worden uitgenomen, en direct opgedeeld in delen welke formaline-gefixeerd worden of in de vloeibare stikstof worden opgeslagen. Bloed wordt opgevangen in EDTA-anticoagulant-gecoated tubes, waarna plasma wordt geïsoleerd. In het geïsoleerde lever en miltweefsel kunnen we bestuderen of we de in de literatuur bevonden rol van IL37 expressie tijdens sepsis kunnen bevestigen.

De uitleesparameters zijn:

- plasma ureum en creatinine waarden als maat van nierfunctiestoornissen, plasma ASAT en ALAT concentraties als maat van leverfunctiestoornissen
- plasma cytokine/chemokine waarden, als maat van systemische ontstekingsniveau.
- locale nier cytokine/chemokine concentraties, als maat van lokale nierontstekingsniveau
- nier histopathologie en lokale mRNA expressiewaarden van tubulaire schademarkers (NGAL en KIM-1), als maat voor nierschade.
- nier mRNA expressie waarden van ontstekingsparameters, als maat van lokale ontstekingsreacties.
- milt en lever mRNA expressie waarden van ontstekingsparameters, als maat van lokale ontstekingsreacties ter bevestiging van de bevonden effecten in de literatuur.

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

1. Eenmalige intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS of vehicle (saline). Dit is in de literatuur het meest gangbare en gestandaardiseerde model om sepsis en daaropvolgend AKI te induceren. De dosis is gekozen aan de hand van studies in de literatuur welke dezelfde dosis gebruiken in modellen van sublethale sepsis met behulp van zelfde C57BL/6J muizen.
2. Offeren op verschillende tijdstippen onder volledige anesthesie.

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

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, zal worden berekend door middel van een poweranalyse. Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van het functionele beschermende effect van IL37 tijdens sepsis-gemedieerd AKI, gebruiken we de plasma ureum waarden. We stellen tenminste 50% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de functie van IL37.

Op dit moment maken we met een schatting gebruik van maximaal $n=15$ muizen benodigd per groep. In totaal gebruiken we 2 stammen x 5 tijdstippen (vehicle 4uur, LPS 2u, LPS 4u, LPS 24u, LPS 48u) x ($n=15$ /groep) = 150 muizen (75x WT; 75x hIL37tg).

B. The animals

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

In deze studie gebruiken we wild type C57BL/6J muizen als controle en de hIL37tg muisstam, welke humaan IL37 constitutief tot expressie brengt. Dit is de enige muisstam welke IL37 constitutief tot expressie brengt, en vormt zodoende een unieke tool om de functionele bijdrage van IL37 in een experimenteel model van sepsis-gemedieerd AKI te bestuderen. De achtergrond van deze muis is een C57BL/6J, zodat deze stam fungeert als referentie.

In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerde AKI **uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexeverschillen zijn in de immunologische respons tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK *et al.* Virulence 2014; Marriott I *et al.* Immunologic Research 2006; Marriott I *et al.* Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M *et al.* Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen wij niet goed inschatten. Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.**

De gevoeligheid van muizen voor sepsis wordt o.a. bepaald door de leeftijd; hoe ouder de muis hoe gevoeliger deze is voor het ziektebeloop. Wij kiezen voor de meest gangbare leeftijd welke in eerdere studies is gebruikt voor de leeftijd (8-12 weken). Deze leeftijdscategorie in combinatie met de gekozen dosis van de LPS injectie wordt in vele studies toegepast. Door dezelfde condities aan te houden beogen we de spreiding in uitleesparameters en gevoeligheid voor het experimenteel model te minimaliseren, welke het totale aantal muizen per groep vermindert.

Schatting totaal te gebruiken dieren per stam:

-C57BL/6J: n=75

-hIL37tg: n=75

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus, C57BL/6J wild type		75	8-12 weken
mus musculus; hIL37tg		75	8-12 weken

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.

Vervanging:

Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest in geïsoleerde celsystemen met behulp van primaire cellen afkomstig van de hIL37tg muis, welke zijn blootgesteld aan LPS. Endogene IL37 expressie blijkt een remmende werking te hebben op de ontstekingsreacties van deze cellen. Echter, omdat sepsis-gemedieerd AKI een zeer complex proces is waarbij meerdere orgaansystemen betrokken zijn, is het onmogelijk om alle

benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Daarom is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld.

Verfijning:

Tijdens deze experimenten gebruiken we muizen, waaronder de hIL37tg muisstam welke IL37 constitutief tot expressie brengt. Deze stam is de enige, en daarmee ook de beste tool die momenteel beschikbaar is om de rol van IL37 in experimentele modellen *in vivo* te kunnen onderzoeken. Het gebruik van 'lagere' diersoorten waarin IL37 tot expressie komt, is dan ook niet mogelijk om de effecten van sepsis-gemedieerd AKI na te bootsen. Daarnaast is dit model van LPS-induced sepsis in de muis een veelvuldig gebruikt en gestandaardiseerd experimenteel model in de wetenschappelijke literatuur. Er wordt gekozen voor een sublethale dosis (aan de hand van de literatuur), waardoor geen bovenmatige uitval verwacht wordt.

Vermindering:

Voordat het dierexperiment aanvangt is allereerst berekend hoeveel dieren we minimaal nodig hebben per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten die voortvloeien uit een experiment (poweranalyse). Dit minimum aantal dieren zal dan worden geïncludeerd. Het is essentieel om de rol van IL37 expressie in zowel de acute alsook latere fase van sepsis-gemedieerd AKI te onderzoeken, aangezien op verschillende tijdstippen verschillende effecten belangrijk zijn. In de vroegere fase zal met name de ontstekingsreactie worden opgewekt, zodat we daar de rol van IL37 expressie in kunnen bestuderen. Op latere momenten kunnen we juist de effecten van IL37 expressie op functioneel niveau bestuderen, zoals orgaanfuncties en de mate van ontstekingsreacties. Als controle groep kiezen we voor de inclusie van slechts één tijdstip van offeren (4 uur na injectie) in plaats controle groepen op alle tijdstippen mee te nemen.

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

Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: **daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). Ter verlichting van het ongerief **zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven.** Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere spuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende verschillende typen uitleesparameters te onderzoeken (acute fase, latere functionele fase). De muizen worden zeer frequent gemonitord op deze algehele verschijnselen door de onderzoekers in samenwerking met de ██████████ en ██████████. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt. Het includeren van de latere tijdstippen (24uur en 48uur) is noodzakelijk om de rol van IL37 expressie te kunnen bestuderen op functioneel niveau en daaropvolgende recovery.

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.

No

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.

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.

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?

Als gevolg van de experimentele handeling (LPS injectie) ontwikkelen de muizen sepsis met daaropvolgend acuut nierfalen. Hierdoor wordt een sterke mate van aantasting van het welzijn veroorzaakt.

De lichamelijke activiteit zal sterk verminderd worden, in combinatie met **een daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde hydratatie, verminderde eetlust en gewichtsafname. Naargelang de muizen langer in studie zitten, zullen de bovengenoemde effecten sterker zijn.

Er wordt gekozen voor een sublethale dosis van LPS (10mg/kg), gebaseerd op andere studies in de literatuur. Dit houdt in dat, ondanks de hoge mate van ongerief, de muizen hieraan niet direct overlijden. Wij zijn met name geïnteresseerd in de rol van IL37 in de vroegere fasen van het ziekteproces (eerste 48 uur na het induceren van sepsis), waardoor de muizen hooguit 48 uur in het experiment zullen zitten.

Explain why these effects may emerge.

De intraperitoneale injectie van LPS zorgt voor het ontwikkelen van sepsis. De klinische effecten als gevolg hiervan zorgen voor een mate van ernstig ongerief.

Pijnbestrijding (zoals buprenorphine of carprofen) ter verlichting van pijn is in dit model niet zinvol, aangezien de muizen geen fysieke pijn lijden als gevolg van een ingreep, maar wel doodziek zijn als gevolg van de ontwikkelde sepsis. Tevens willen wij de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) bestuderen; het gebruik van NSAID's (anti-inflammatoir middel) zou dus al zelf een effect hebben op de ontstane ontstekingsreacties, en zodoende de mogelijke effecten van IL37 kunnen beïnvloeden.

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

Ter verlichting van het ongerief zal voer worden aangeboden in de kooi (papvoer) in plaats van in de ruif. Tevens zal gebruik gemaakt worden van drinkflessen met een extra lange tuit, zodat de muizen zich minder ver hoeven te strekken om te kunnen drinken. **De kooien worden voor een deel geplaatst op warmtematjes, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven om zo hun lichaamstemperatuur op peil te houden.**

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.

De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma)

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-te hoge totaal score (5 of hoger) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, en welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48 uur in het experiment.

Indicate the likely incidence.

Naarmate de muizen langer in studie zitten (24uur/48uur) kan de incidentie van het humaan eindpunt groter worden in wild type muizen ten opzichte van de vroegere tijdstippen. Er wordt echter een sublethale dosis LPS gebruikt, waardoor de muizen hier niet aan hoeven te overlijden. Zoals bekend uit de literatuur (Nold M *et al.* Nat Imm 2010) tonen hIL37tg muizen tekenen van bescherming tegen de effecten van sepsis-gemedieerde shock. Onze hypothese stelt dat hIL37tg muizen ook functioneel beschermd zijn tegen het ontwikkelen van sepsis-gemedieerde AKI. De incidentie van humaan eindpunt in deze experimentele groep zal daarom naar onze verwachting lager zijn ten opzichte van de controle groep (wild type muizen).

De verwachte incidentie in WT muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in de hIL37tg muizen is 0-5%.

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).

De mate van ongerief in de experimentele groepen welke LPS injecties krijgen is ingeschat als ernstig. Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien deze het gevolg is van het induceren van sepsis door middel van LPS injecties.

Aan de hand van de hypothese wordt in de hIL37tg muisgroep (**40%**) een matig niveau van ongerief verwacht ten opzichte van de wild type controle muizen (**ernstig; 40%**).

De mate van ongerief in de controle groepen wordt ingeschat als mild (**20%**), aangezien deze muizen geen sepsis zullen ontwikkelen.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

De groepen muizen zullen actief worden geofferd op verschillende tijdstippen na de initiële injectie van LPS, ten einde om organen en bloed te kunnen isoleren.

Hierin kunnen we belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters bestuderen welke essentieel zijn voor het bestuderen van de rol van IL37 in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen.

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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Deelexp. B: Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening gedurende sepsis-gemedieerd AKI

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 dit deelproject worden alleen C57BL/6J wild type muizen gebruikt. Alle interventiegroepen worden aan elkaar gematched aan de hand van geslacht (man) en leeftijd (8-12 weken oud) (voor motivatie geslacht/leeftijd, zie B).

Ter inductie van sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen (AKI) ontvangen groepen WT muizen een eenmalige sublethale intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS ofwel vehicle (saline) als controle. Daarna ontvangen groepen WT muizen een dosis van ofwel vehicle, recombinant IL37 eiwit, ofwel erythropoietin (EPO). De benodigde dosis van recombinant IL37 eiwit en EPO wordt bepaald aan de hand van studies uit de literatuur welke al beschermende effecten van deze componenten (in andere modellen) hebben laten zien. Hierdoor zijn er uiteindelijk de volgende deelgroepen:

groep 1-1: vehicle + saline

groep 1-2: vehicle + recombinant IL37

groep 1-3: vehicle + EPO

groep 2-1: LPS + saline

groep 2-2: LPS + recombinant IL37

groep 2-3: LPS + EPO

Het ziektebeloop van de muizen wordt vervolgens gemonitord, en vervolgens worden groepen muizen geofferd op verschillende tijdstippen (24uur; 48uur) na de primaire LPS injectie om de therapeutische potentie te onderzoeken. Om de therapeutische effecten van recombinant IL37 (en EPO) te onderzoeken, gebruiken we deze tijdstippen aangezien hierop het effect van deze componenten op het ontstaan van sepsis-geïnduceerd orgaanfalen het grootst is. Op vroegere tijdstippen (zoals 2uur/4uur) verwachten we nog geen effecten te kunnen gaan zien op parameters welke orgaanfalen demonstreren.

Alle muizen worden geofferd door middel van cervicale dislocatie, waarna bloed, nieren, lever en miltweefsel worden uitgenomen, en direct opgedeeld in delen welke formaline-gefixeerd worden of in de vloeibare stikstof worden opgeslagen. Bloed wordt opgevangen in EDTA-anticoagulant-gecoated tubes, waarna plasma wordt geïsoleerd. In het geïsoleerde lever en miltweefsel kunnen we bestuderen of we de in de literatuur bevonden effecten van LPS-geïnduceerde sepsis kunnen reproduceren.

Primaire uitleesparameters zijn:

- plasma ureum en creatinine waarden als maat van nierfunctiestoornissen, plasma ASAT en ALAT concentraties als maat van leverfunctiestoornissen.
- plasma cytokine/chemokine waarden als maat van systemische ontstekingsniveau
- locale nier cytokine/chemokine concentraties als maat van lokale nierontstekingsniveau
- nier histopathologie en lokale mRNA expressiewaarden van tubulaire schademarkers (NGAL en KIM-1) als maat van nierschade.
- nier mRNA expressie waarden van ontstekingsmarkers, als maat van lokale ontstekingsniveau
- lever en milt mRNA expressie waarden van ontstekingsparameters, als maat van lokale ontstekingsreacties

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

-
1. Eenmalige intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS of saline
 2. Eenmalige subcutane injectie van (a) saline, (b) recombinant IL37 eiwit, (c) recombinant humaan EPO

De toegediende doses zijn bepaald aan de hand van beschreven studies in de literatuur, welke een beschermend effect hebben laten zien van EPO tijdens sepsis-gemedieerd AKI, en studies welke een ontstekingsremmend effect hebben laten zien voor recombinant IL37 eiwit. De toedieningswijze (subcutaan) is gekozen aan de hand van de literatuur, waarin eerder is beschreven dat EPO welke subcutaan werd toegediend een beschermend effect teweeg bracht.

3. Offeren op verschillende tijdstippen onder volledige anesthesie

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

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, zal worden berekend door middel van een poweranalyse. Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van het functionele beschermende effect van IL37 tijdens sepsis-gemedieerd AKI, gebruiken we de plasma ureum waarden. We stellen tenminste 50% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de functie van recombinant IL37. De groepen muizen welke EPO toediening krijgen, fungeren als positieve controle; het is daarom niet nodig een verschil tussen de EPO en recombinant IL37 behandelde groepen te vinden.

Op dit moment maken we met een schatting gebruik van maximaal $n=15$ muizen benodigd per groep **na LPS injectie. Voor de controle groepen welke geen sepsis ontwikkelen maken we een schatting dat we maximaal $n=10$ muizen benodigd hebben per groep.**

In totaal gebruiken we 1 muisstam \times 3 subgroepen \times ($n=15$ /groep) + **3 subgroepen \times ($n=10$ /groep) = 75 muizen (75x WT).**

B. The animals

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

Voor deze setting gebruiken we alleen C57B/6J wild type muizen.

In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerd AKI **uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexeverschillen zijn in de immunologische response tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK *et al.* Virulence 2014; Marriott I *et al.* Immunologic Research 2006; Marriott I *et al.* Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M *et al.* Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen, of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen**

we niet goed inschatten. Wij kiezen er daarom ook voor om alleen mannelijke muizen te gebruiken. **Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.**

De gevoeligheid van muizen voor sepsis wordt o.a. bepaald door de leeftijd; hoe ouder de muis hoe gevoeliger deze is voor het ziektebeloop. Wij kiezen voor de meest gangbare leeftijd welke in eerdere studies is gebruikt voor de leeftijd (8-12 weken). Deze leeftijdscategorie in combinatie met de gekozen dosis van de LPS injectie wordt in vele studies toegepast. Door dezelfde condities aan te houden beogen we de spreiding in de uitleesparameters en gevoeligheid voor het experimenteel model te minimaliseren, welke het totale aantal muizen per groep vermindert.

Schatting totaal te gebruiken dieren per stam:

-C57Bl/6J: **n=75**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus, C57BL/6J		75	8-12 weken

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.

Vervanging:

Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest in geïsoleerde celsystemen met behulp van primaire cellen (immuuncellen en nier epitheelcellen) welke zijn blootgesteld aan LPS, en additioneel gestimuleerd werden met recombinant IL37 eiwit. Hieruit bleek dat het toegediende exogene IL37 eiwit een remmende werking heeft op de ontstekingsreacties die werd opgewekt door LPS in deze cellen. Echter, omdat sepsis-gemedieerd AKI een zeer complex proces is waarbij meerdere orgaansystemen betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze systemen. Daarom is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen. Om de mogelijke potentie van het toegediende recombinant IL37 te vergelijken ten opzichte van andere, reeds beschreven beschermende componenten (EPO), vergelijken we de therapeutische effecten ten opzichte van een groep muizen welke EPO toegediend heeft gekregen.

Verfijning:

Tijdens deze experimenten gebruiken we muizen. Deze diersoort is in de literatuur al veelvuldig gebruikt waarin is gedemonstreerd dat het toedienen van exogeen IL37 eiwit een therapeutisch effect en ontstekingsremmende werking heeft *in vivo*. Voor 'lagere' diersoorten is dat onbekend, en is het niet mogelijk om zelfde modellen voor het ontwikkelen van sepsis-gemedieerd AKI te onderzoeken. Daarnaast is dit model van LPS-induced sepsis in de muis een veelvuldig gebruikt en gestandaardiseerd experimenteel model in de wetenschappelijke literatuur. Er wordt gekozen voor een sublethale dosis (aan de hand van de literatuur), waardoor geen bovenmatige uitval verwacht wordt.

Vermindering:

Voordat het dierexperiment aanvangt is allereerst berekend hoeveel dieren we minimaal nodig hebben per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten die voortvloeien uit een experiment (poweranalyse). Dit minimum aantal dieren zal dan worden geïncludeerd. Aangezien we geen therapeutische effecten verwachten te kunnen bestuderen in een vroege fase, kiezen we alleen voor de inclusie van groepen muizen welke geofferd worden op tijdstippen waarop functionele effecten meetbaar zijn (24uur/48uur).

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

Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: **daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). **Ter verlichting van het ongerief zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven.** Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere tuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid aan de hand van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende functionele effecten te kunnen bestuderen.

De muizen worden zeer frequent gemonitord op deze algehele verschijnselen door de onderzoekers in samenwerking met de [REDACTED] en [REDACTED]. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt.

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.

No

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.

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.

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?

Als gevolg van de experimentele handeling (LPS injectie) ontwikkelen de muizen sepsis met daaropvolgend acuut nierfalen. Hierdoor wordt een sterke mate van aantasting van het welzijn veroorzaakt.

De lichamelijke activiteit zal sterk verminderd worden, in combinatie **met een daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde hydratatie, verminderde eetlust en gewichtsafname. Naargelang de muizen langer in studie zitten, zullen de bovengenoemde effecten sterker zijn.

Er wordt gekozen voor een sublethale dosis van LPS (10mg/kg), gebaseerd op andere studies in de literatuur. Dit houdt in dat, ondanks de hoge mate van ongerief, de muizen hieraan niet direct overlijden. Wij zijn met name geïnteresseerd in de rol van IL37 in de vroegere fasen van het ziekteproces (eerste 48 uur na het ontstaan van sepsis), waardoor de muizen hooguit 48 uur in het experiment zullen zitten.

Explain why these effects may emerge.

De intraperitoneale injectie van LPS zorgt voor het ontwikkelen van sepsis. De klinische effecten als gevolg hiervan zorgen voor een mate van ernstig ongerief.

Pijnbestrijding (zoals buprenorphine of carprofen) ter verlichting van pijn is in dit model niet zinvol, aangezien de muizen geen fysieke pijn leiden als gevolg van een ingreep, maar wel doodziek zijn als gevolg van de ontwikkelde sepsis. Tevens willen wij de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) bestuderen; het gebruik van NSAID's (anti-inflammatoir middel) zou dus al zelf een effect hebben op de ontstane ontstekingsreacties, en zodoende de mogelijke effecten van IL37 kunnen beïnvloeden.

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

Ter verlichting van het ongerief zal voer worden aangeboden in de kooi (papvoer) in plaats van in de ruif. Tevens zal gebruik gemaakt worden van drinkflessen met een extra lange tuit, zodat de muizen zich minder ver hoeven te strekken om te kunnen drinken. **De kooien worden voor een deel geplaatst op warmtematjes, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven om zo hun lichaamstemperatuur op peil te houden.**

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.

De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-Te hoge totaal score (5 of hoger) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48uur in het experiment.

Indicate the likely incidence.

Naarmate de muizen langer in studie zitten (24uur/48uur) kan de incidentie van het humaan eindpunt in wild type muizen als gevolg van sepsis groter worden. Er wordt echter een sublethale dosis LPS gebruikt, waardoor de muizen hier niet aan hoeven te overlijden. Zoals bekend uit de literatuur (Nold M *et al.* Nat Imm 2010) heeft endogene expressie van IL37 een beschermde werking tegen de effecten van sepsis. Daarnaast is uit overige studies bekend dat exogeen toegediend recombinant IL37 een beschermende werking geeft in verschillende experimentele modellen (Moretti S *et al.* PLoS Pathog 2014; Ballak DB *et al.* Nat Commun 2014; Li S *et al.* PNAS 2015). Onze hypothese stelt dat het exogeen toegediend recombinant IL37 eiwit ook functioneel beschermt tegen het ontwikkelen van sepsis-gemedieerde AKI. De incidentie van het bereiken van het humaan eindpunt in deze experimentele groep zal daarom naar onze verwachting lager zijn ten opzichte van de controle groep (LPS+vehicle).

In verschillende studies is laten zien dat EPO toediening een beschermend effect heeft tijdens sepsis-gemedieerd AKI (Coldewey SM *et al.* Kidney Int 2013; Aoshiba K *et al.* Crit Care Med 2009). De incidentie van het bereiken van het humaan eindpunt in deze experimentele groep (welke fungeert als positieve controle) zal daarom naar onze verwachting ook lager zijn ten opzichte van de controle groep (LPS+vehicle).

De groepen muizen welke allereerst vehicle krijgen in plaats van LPS zullen geen sepsis en/of AKI ontwikkelen, waardoor de incidentie van het humaan eindpunt in deze groepen muizen minimaal zal zijn.

De verwachte incidentie in WT+LPS muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in WT+rec.IL37 en/of EPO muizen is 0-5%. De verwachte incidentie in de vehicle groepen is 0%.

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).

De mate van ongerief in de LPS+vehicle groep is ingeschat als ernstig (**20%**). De andere groepen muizen (LPS+recombinant IL37 en LPS+EPO) worden ingeschat als matig ongerief (**40%**).

De mate van ongerief in de controle (vehicle) groepen wordt ingeschat als mild (**40%**), aangezien deze muizen geen sepsis en/of AKI zullen ontwikkelen.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

De groepen muizen zullen actief worden geofferd op verschillende tijdstippen na de initiële injectie van LPS gevolgd door injectie met vehicle/IL37/EPO, ten einde om organen en bloed te kunnen isoleren.

Hierin kunnen we belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters bestuderen welke essentieel zijn voor het bepalen van de rol van exogene IL37 toediening in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen, en deze effecten te kunnen vergelijken met de beschermende werking van EPO toediening.

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 2015-0101
2. Titel van het project: Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
3. Titel van de NTS: Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens bloedvergiftiging?
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: 25-08-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-09-2015 en 06-10-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-09-2015 tot 22-09-2015 en van 13-10-2015 tot 15-10-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-09-2015 en 15-10-2015
 - advies aan CCD: 12-11-2015
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: 15-09-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.5 De categorie matig tot ernstig ongerief bestaat niet. De onderzoekers worden verzocht op te schrijven welk percentage van de dieren matig en welk percentage ernstig ongerief zullen ondergaan.
 - 4.2 Voor een leek zal het niet duidelijk zijn waarom dit leidt tot vermindering. Is het genoemde aantal dieren een minimum of een maximum aantal?

4.4 De onderzoekers worden verzocht alleen de maatregelen te noemen die het ongerief voor de proefdieren zo beperkt mogelijk houden. Het is onwenselijk hier te noemen dat elk experiment zeer goed wordt voorbereid en alleen wordt uitgevoerd door gecertificeerde onderzoekers, aangezien men er van uit mag gaan dat onderzoekers altijd gecertificeerd zijn en zich zeer zorgvuldig zullen voorbereiden op een experiment. Dit zijn voorwaarden om proefdieronderzoek te mogen doen, en geen maatregelen die een onderzoeker neemt om het ongerief voor de dieren te beperken.

Project Proposal:

-3.1 De laatste 25 jaar is er een enorme hoeveelheid onderzoek verricht om de 'magic bullet' te vinden die zou kunnen beschermen tegen multi-orgaanfalen door sepsis. Historisch gezien heeft dergelijk onderzoek nauwelijks translationele waarde gehad, omdat de positieve bevindingen in een veelheid van diermodellen niet extrapoleerbaar bleken naar de mens. Waarom verwachten de onderzoekers dat in dit specifieke geval hun eventuele resultaten wel translationele waarde zullen hebben? Zijn er voorbeelden beschikbaar waar onderzoek in de muis geleid heeft tot (meer dan ondersteunende) therapie bij dit ziektebeeld in de mens?

-3.1. Kunnen de onderzoekers hier uitgebreider toelichten waarom de hIL37tg muis een goed model is voor de humane situatie? Zij worden verzocht daarbij ook aan te geven wanneer IL37 tot expressie komt in de transgene dieren en in de mens, en op welke receptor het hIL37 in de muizen werkt.

3.4.3 Uit translationeel oogpunt is het logischer om eerst onderdeel B te doen, en alleen bij bewezen effect het werkingsmechanisme uit te zoeken (onderdeel A). Het uitblijven van een therapeutisch effect zou dan een 'no go moment' vormen voor de experimenten met de hIL37tg muis.

Description of Animal Procedures:

-DAP 1.

*B De onderzoekers willen mannelijke muizen gebruiken om 'de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerd AKI te minimaliseren' (of uit te sluiten?). Welke aanwijzingen hebben de onderzoekers dat de hormooncyclus een dergelijk effect kan hebben in deze proefopzet? Kunnen zij een schatting maken van de toename in spreiding indien zij ook vrouwelijke dieren zouden gebruiken en tot welke toename in proefdieraantallen dit zou leiden?

*D, tweede vraag. Temperatuurdaling als gevolg van LPS-injectie ontbreekt in de opsomming (ook bij onderdeel I). De commissie denkt dat het goed zou zijn om hier ook de mogelijke maatregelen te bespreken om de welzijnsgevolgen van de temperatuurdaling te beperken (bijvoorbeeld een couveuse). Als daar van af wordt gezien, dan zou ook vermeld moeten worden waarom dergelijke maatregelen niet mogelijk zijn.

*J. De onderzoekers worden verzocht de humane eindpunten preciezer te formuleren, en de geschatte incidentie getalsmatig (bijvoorbeeld als percentage) uit te drukken.

*K. Het percentage van de dieren dat respectievelijk ernstig, matig of licht ongerief zal ondergaan is niet gegeven.

-DAP2

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en dit aan te passen.

*A. Het ziektebeloop van de muizen in groep 2-3 en groep 2-2 zal worden vergeleken met het ziektebeloop van de muizen in groep 2-1. Waartoe dienen de drie vehicle groepen en waarom zijn daar ook 15 dieren per groep voor nodig?

- Datum antwoord: 22-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-(3.5) In het beschreven project zullen enkele groepen proefdieren worden blootgesteld aan moderate of ernstig ongerief. De verwachting is dat de wild type muizen ernstig ongerief zullen ondervinden (ongeveer 40%), terwijl de transgene muis welke IL37 tot expressie brengt matig ongerief zal ondervinden (ongeveer 40%). De controle groepen zullen slechts mild ongerief krijgen, aangezien deze geen sepsis zullen ontwikkelen (ongeveer 20%).

-(4.2) Het minimum aantal muizen wat is benodigd per experimentele groep om mogelijke verschillen tussen groepen aan te tonen is berekend aan de hand van resultaten uit reeds beschreven studies uit de literatuur. Door deze gegevens te gebruiken voor het opzetten van de huidige studie wordt voorkomen dat onnodig teveel dieren worden geïncubeerd per experimentele groep. Het op deze manier berekende totaal aantal benodigde dieren is 240 muizen (zie 3.3).

-(4.4) Om de negatieve gevolgen van het ontstaan van bloedvergiftiging te beperken zullen de muizen in een verwarmde omgeving worden gezet, zodat de lichaamstemperatuur beter op peil kan worden gehouden. Tevens wordt gezorgd voor een vergemakkelijkt aanbod van drinkwater en voer (gebruik van verlengde spuitmond van drinkfles en papvoer in kooi), waardoor de toegankelijkheid geoptimaliseerd is. Daarnaast zullen de negatieve gevolgen van een experiment zeer strikt worden beschreven en gecontroleerd door zowel de onderzoeker als medewerkers van het dierenlaboratorium. Mochten de negatieve gevolgen voor de dieren groter zijn dan de beschreven verwachte gevolgen, zal er actie ondernomen worden waarbij het dier geofferd wordt.

Project Proposal:

-(3.1) Wij onderschrijven dat met name in dit onderzoeksveld meerdere therapeutische strategieën die veelbelovend leken op basis van proefdieronderzoek niet werkzaam bleken bij de mens. Wij verwachten ook niet de 'magic bullet' te vinden die multi-orgaanfalen bij sepsis kan voorkomen. Echter, gezien de frequentie en ernst van het ziektebeeld zijn ook kleinere bijdragen aan een betere prognose en/of therapie voor deze patiënten meer dan welkom. Wij kunnen ons niet goed voorstellen hoe wetenschappelijke en medische vooruitgang kan worden geboekt zonder potentiële therapeutische strategieën uit te testen in proefdiermodellen.

Enkele voorbeelden van de afgelopen jaren waarbij onderzoek op dit gebied bij muizen/ratten heeft geleid tot toepassingen bij de mens zijn het beschermend effect van alkalisch fosfatase op sepsisgeïnduceerd acuut nierfalen (Pickkers P et al. Crit Care 2012), en het gunstig effect van interferon-beta-1a op ARDS (Bellingan G et al. Lancet Respir Med 2014).

Recent is een sterke focus ontstaan op de ontrafeling van cascades behorende tot het aangeboren immuunsysteem, en de rol daarvan in de pathofysiologie van sepsis.

Fundamenteel en preklinisch onderzoek heeft uitgewezen dat onder andere toll-like receptoren (TLR2 en TLR4) behorende tot het aangeboren immuunsysteem een belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van sepsis. Meerdere klinische trials zijn momenteel lopende om de effecten van specifieke antagonisten voor receptoren van het aangeboren immuunsysteem te onderzoeken. Zo neemt het [REDACTED] deel aan een multicenter studie naar het effect van een antistof tegen TLR2 bij ischemie-reperfusie schade na niertransplantatie. Een belangrijke conclusie die wordt getrokken uit de resultaten van afgeronde studies is dat de blokkade van één specifieke receptor-ligand interactie hoogstwaarschijnlijk niet afdoende blijkt om de gehele pathofysiologie van sepsis en nierfalen te kunnen remmen/voorkomen. In het huidige project focussen wij op het anti-inflammatoire cytokine Interleukine-37, wat een algemene remmer is van het aangeboren immuunsysteem. De werking van IL37 is niet gericht tegen één specifieke receptor, maar remt verschillende immunologische signaleringscascades, waaronder die van TLR2, TLR4 en TLR9 (Nold MF et al. Nat Immunol 2010). Daarnaast is gebleken dat de transgene expressie van IL37 een beschermende werking geeft tegen het ontwikkelen van sepsis bij de muis (Nold MF et al. Nat Immunol 2010), zonder dat daarbij specifiek is gekeken naar het effect op de nier en het ontstaan van acuut nierfalen. Onze hypothese is dat IL37 een remmende werking heeft op ontstekingsprocessen en daarmee beschermt tegen nierfalen als gevolg van sepsis. Op basis van de belangrijke rol van het aangeboren immuunsysteem in de pathofysiologie van sepsis, de zeer krachtige ontstekingsremmende werking van IL37 in verschillende fundamentele en preklinische studies en het feit dat IL37 een endogeen humaan molecuul is, hopen wij dat de behaalde resultaten van deze studie translationele waarde zullen hebben.

-(3.1) In de mens komt IL37 in vele celtypen tot expressie, waaronder verschillende subtypen immuuncellen (zoals leukocyten en dendritische cellen) alsook in (nier) epitheliale cellen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Basale endogene expressie van IL37 is laag, en wordt pas sterk opgereguleerd door inflammatoire stimuli (Bufler P et al. Biochem J. 2004; Imaeda H et al. Clin Exp Immunol 2013). De ontstekingsremmende werking van IL37 verloopt zowel via intracellulaire cascades die de transcriptie van proinflammatoire genen remmen (door 'endogene' IL37 expressie), als via exogeen IL37 wanneer dit eiwit aanwezig is in het extracellulaire milieu (Bulau AM et al. PNAS 2014). Extracellulair IL37 kan zijn ontstekingsremmende werking uitvoeren door binding aan de alfa-keten van de IL18-receptor (IL18R), in samenwerking met de co-receptor IL1R8 (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015; Li S et al. PNAS 2015). Aangezien er bij de muis geen homoloog van humaan IL37 bekend is, wordt voor de bestudering van de rol van IL37 in vivo gebruik gemaakt van een muis welke transgeen gemaakt is voor humaan IL37 (hIL37tg). Deze hIL37tg muis brengt humaan IL37 constitutief in alle lichaamscellen tot expressie, en vormt zo de basis voor het huidige en reeds verrichte onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van IL37 (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Ondanks dat IL37 expressie gekoppeld is aan de constitutief actieve CMV-promoter in alle transgene cellen, is de basale transcriptie laag en vindt er opregulering plaats door inflammatoire stimuli (Nold et al. Nat Imm 2010). Hierdoor komt de kinetiek van IL37 expressie in deze hIL37tg muis overeen met de humane situatie. Ook voor exogeen toegediend IL37 eiwit is er in een muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waaraan IL37 bindt) (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015). In verschillende experimentele modellen met behulp van

de hIL37tg muis is gebleken dat IL37 een zeer krachtige anti-inflammatoire en beschermende functie heeft in diverse ziekteprocessen, waaronder colitis (McNamee EN et al. PNAS 2011), obesitas (Ballak DB et al. Nat Commun 2014), myocardiaal infarct (Wu B et al. Clin Exp Immunol 2014) en nier ischemie/reperfusie schade (Yang Y et al. Kidney Int 2014). Tevens is met behulp van de hIL37tg muis beschreven dat IL37 expressie een beschermende werking heeft tegen het optreden van LPS-geïnduceerde septische shock, welke leidt tot een sterke reductie van de systemische spiegels van diverse pro-inflammatoire cytokines en verminderde leverfunctiestoornissen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). In deze studie is echter niet gekeken naar de effecten van IL37 expressie op de lokale pathofysiologische consequenties van sepsis in de nier, en ook niet naar de effecten van IL37 op LPS-geïnduceerd AKI.

-(3.4.3) Er zal worden begonnen met het uitvoeren van deelexperiment A, gevolgd door deelexperiment B. De resultaten uit deelexperiment A zullen niet de opzet van deelexperiment B beïnvloeden, aangezien in beide deelexperimenten naar verschillende vormen van IL37 eiwit gekeken wordt (in deelexperiment A kijken we naar de rol van endogeen IL37 expressie; in deelexperiment B kijken we naar het effect van toegediend exogeen IL37 eiwit). Uit een recente studie is gebleken dat endogene IL37 expressie een beschermend effect geeft op het ontwikkelen van sepsis (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Hierdoor is naar onze verwachting deelexperiment A optimaal om de werking van endogeen IL37 in het ontstaan van AKI als gevolg van sepsis te bestuderen. Extracellulair IL37 kan additieve effecten hebben bovenop de rol van endogeen IL37. Dit blijkt uit het feit dat het voorbehandelen van hIL37tg muizen met IL37-blokkerende antilichamen een geneutraliseerd effect geeft na LPS toediening (Bulau AM et al. PNAS 2014). Het uitblijven van een eventueel therapeutisch effect van exogene IL37 toediening in deelexperiment B hoeft dus niet te betekenen dat er geen functie en/of rol is voor endogene IL37 expressie in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens sepsis (deelexperiment A). Wanneer er wel een effect gevonden wordt van endogene IL37 expressie (doel van deelexperiment A) kan dit namelijk aanleiding geven tot vervolgstudies waarin getracht wordt om het endogene expressie niveau van IL37 te moduleren, om zodoende bescherming te bieden tegen sepsis-gemedieerd AKI. Naar ons idee hoeven de resultaten van beide deelexperimenten elkaar dus niet te blokkeren.

Description of Animal Procedures:

Bijlage 1 (DAP1)

-(B) In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerde AKI uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexe-verschillen zijn in de immunologische respons tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK et al. Virulence 2014; Marriott I et al. Immunologic Research 2006; Marriott I et al. Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M et al. Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen we niet goed inschatten. Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te

herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.

-(D 2e vraag; en I) Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: daling van de lichaamstemperatuur, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). Ter verlichting van het ongerief zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven. Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere spuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende verschillende typen uitleesparameters te onderzoeken (acute fase, latere functionele fase).

Deze vermelding van daling in lichaamstemperatuur als gevolg van sepsis en het gebruik van warmtematjes ter verlichting van het ongerief is tevens opgenomen onder onderdeel I.

-(J-2): De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-Te hoge totaal score (≥ 5) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijns-scoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48uur in het experiment.

-(J-3): De verwachte incidentie in WT muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in de hIL37tg muizen is 0-5%.

-(K) De mate van ongerief in de experimentele groepen welke LPS injecties krijgen is ingeschat als ernstig. Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien deze het gevolg is van het induceren van sepsis door middel van LPS injecties.

Aan de hand van de hypothese wordt in de hIL37tg muisgroep (40%) een matig niveau van ongerief verwacht ten opzichte van de wild type controle muizen (ernstig; 40%).

De mate van ongerief in de controle groepen wordt ingeschat als mild (20%), aangezien deze muizen geen sepsis zullen ontwikkelen.

Bijlage 2 (DAP2):

- Ook voor DAP2 zijn de velden aangepast met betrekking tot 'gekozen sexe' (B), 'welzijnsgevolgen' (D-2 en I), 'humaan eindpunt en incidentie' (J-2/3) en (K).

-(A) De groepen 1-1 (vehicle+saline), 1-2 (vehicle+recombinant IL37) en 1-3 (vehicle+ EPO) dienen ervoor om de individuele basale effecten van het toegediende IL37 en EPO te karakteriseren. De toegediende componenten kunnen namelijk al een basaal effect teweeg brengen op bijvoorbeeld functionele parameters en/of inflammatoire markers (gen expressie

levels en/of basale cytokine waarden, infiltratie van inflammatoire cellen in nierweefsel). Om een gedegen uitspraak te kunnen doen over de effectieve (beschermende) gevolgen van recombinant IL37 en/of EPO toediening tijdens het ontwikkelen van sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, dienen we ook deze basale effecten in kaart te brengen. IL37 en EPO signaleren en functioneren beiden via andere signaleringscascades, zodat het niet mogelijk is om deze te combineren in één controlegroep. Groep 1-1 fungeert als de basale controle groep.

Naar onze inschatting zal er in de 3 controle groepen minder spreiding in de uitleesparameters optreden in vergelijking met de resultaten afkomstig uit groepen 2-1, 2-2 en 2-3, welke wel sepsis ontwikkelen. We hebben daarom een wijziging doorgevoerd zodat we voor deze controle groepen in plaats van 15 maximaal 10 muizen/groep benodigd denken te hebben. Deze veranderingen zijn doorgevoerd in (3-1), (K-1) en 'Table:Animals'.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum:13-10-2015

- Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting

-Het aantal muizen is aangepast in de bijlagen, maar nog niet in de NTS. De onderzoekers worden verzocht dit alsnog te doen.

- Datum antwoord: 15-10-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet technische-samenvatting:

-Naar aanleiding van deze opmerking zijn voor zowel paragraaf (3.3) en (4.2) in de NTS de wijzigingen doorgevoerd, en zodoende de correcte hoeveelheid te gebruiken muizen weergegeven (n=225 muizen totaal; n=75 muizen in deelproject B).

- 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 'het bestuderen van de functionele contributie en de therapeutische potentie van het ontstekingsremmend eiwit IL37 in sepsis-gemedieerd AKI.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de rol is van endogeen IL37 tijdens sepsis en het daaropvolgend acuut nierfalen bij muizen. Voorts zal duidelijk worden of toediening van IL37 (dus exogeen IL37) de nierschade door sepsis bij muizen kan verminderen. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Acuut nierfalen komt frequent voor bij mensen die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en wordt voornamelijk veroorzaakt door sepsis. Het is aannemelijk dat meer inzicht in de moleculaire en cellulaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van acuut nierfalen door sepsis bij muizen zal bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische interventies. De commissie heeft gediscussieerd over de predictieve validiteit van het gebruikte model. De antwoorden van de onderzoeker op de vragen die de commissie hierover heeft gesteld, hebben de commissie voldoende overtuigd. Op dit moment is er geen effectieve behandeling van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, waardoor de helft van de patiënten hier op korte of langere termijn aan overlijdt. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor sepsis-gemedieerd nierfalen, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.
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 de functie van IL37 in moleculaire en cellulaire mechanismen tijdens sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, en het effect van toediening van IL37 ter preventie van acuut nierfalen door sepsis bij muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gevolgen van de intraperitoneale injectie van LPS. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde i.p. of s.c. injecties en het doden onder anesthesie in als licht. Het ongerief als gevolg van de LPS injectie en daarop volgende systemische afweerreactie schat de DEC in als matig voor de muizen die transgeen zijn voor humaan IL37, en ernstig voor de wildtype dieren. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 27% van de dieren, matig voor 40% van de dieren en ernstig voor de overige 33% van de 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. De onderdelen van dit project die in vitro onderzocht kunnen worden zijn reeds uitgevoerd. Voor de resterende onderdelen is onderzoek met dieren noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het verminderen van het aantal dieren in de controlegroepen, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 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. Er wordt adequate invulling gegeven aan de extra verzorgingsbehoefte van de zieke dieren. Op verzoek van de commissie krijgen de zieke dieren ook de mogelijkheid op een verwarmde ondergrond te verblijven. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de bijdrage van IL37 in de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, en in het effect van toediening van IL37 ter preventie van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen bij muizen. Op termijn kunnen deze inzichten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Het belang van deze wetenschappelijke inzichten en de ontwikkeling van therapieën voor sepsis-gemedieerd acuut nierfalen acht de DEC substantieel, gezien het frequent optreden van acuut nierfalen door sepsis bij patiënten die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en de ernst van deze complicatie.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 27% van de dieren licht ongerief, 40% van de dieren matig ongerief en 33% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het sepsismodel 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 onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015313

Betreft: Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Factuurdatum: 17 november 2015
Vervaldatum: 17 december 2015
Factuurnummer: 15700313
Factuurnummer: 040823-461220/2015-0101/[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015313	€ 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.



> 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
AVD103002015313

Bijlagen

2

Datum 17 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015313. 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 aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, t.a.v. ██████████
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: Postdoctoraal onderzoeker
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

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: 12 december 2015
Geplande einddatum: 12 december 2020
Titel project: Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
Titel niet-technische samenvatting: Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfal
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: 13 november 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
AVD103002015313

Bijlagen

2

Datum 17 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 november 2015

Vervaldatum: 17 december 2015

Factuurnummer: 15700313

Ordernummer: 040823-461220/2015-0101/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015313	€ 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101 t.a.v. [REDACTED]
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
AVD103002015313
Bijlagen

1

18 DEC. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?" met aanvraagnummer AVD103002015313. 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 "Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?" starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 12 december 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 12 november 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.

Wij hebben bij de beraadslaging het volgende mee gewogen over het gebruik van alleen mannelijke dieren: De commissie ziet dat het een project betreft dat aan het begin staat van nieuwe ontwikkelingen. Er zijn daarom veel variabelen in de experimentele opzet die spreiding in de data kunnen veroorzaken. Het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren kan in dit geval resulteren in zoveel spreiding in de data dat de gestelde projectdoelen niet gehaald kunnen worden. Daarom is besloten het gebruik van alleen mannelijke dieren in dit specifieke project toe te staan.

Voor een eventueel vervolgproject blijft het uitgangspunt van de CCD van kracht dat zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt dienen te worden. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Met het oog op artikel 10a2 van de Wod zijn twee algemene voorwaarden toegevoegd.

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, t.a.v. [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 12 december 2020, voor het project "Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?" met aanvraagnummer AVD103002015313, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoctoraal onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is de postdoctoraal onderzoeker nefrologie verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 november 2015, ontvangen op 14 november 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
proef 1: Deelexp. A: Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in sepsis-gemedieerd AKI	Muizen (Mus musculus) / hIL37tg dieren en C57BL/6J wild type (Charles River)	150	Ernstig / severe	Er worden transgene dieren gebruikt
proef 2: Deelexp. B: Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening gedurende sepsis-gemedieerd AKI	Muizen (Mus musculus) / C57B/6J wild type (Charles River)	75	Ernstig / severe	nvt

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.

Voorschriften

Omdat er sprake is van ernstig ongerief is een beoordeling achteraf vereist, uiterlijk 12 december 2021.

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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b 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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0101
2. Titel van het project: Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
3. Titel van de NTS: Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens bloedvergiftiging?
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: 25-08-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-09-2015 en 06-10-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-09-2015 tot 22-09-2015 en van 13-10-2015 tot 15-10-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-09-2015 en 15-10-2015
 - advies aan CCD: 12-11-2015
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: 15-09-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
3.5 De categorie matig tot ernstig ongerief bestaat niet. De onderzoekers worden verzocht op te schrijven welk percentage van de dieren matig en welk percentage ernstig ongerief zullen ondergaan.
4.2 Voor een leek zal het niet duidelijk zijn waarom dit leidt tot vermindering. Is het genoemde aantal dieren een minimum of een maximum aantal?

4.4 De onderzoekers worden verzocht alleen de maatregelen te noemen die het ongerief voor de proefdieren zo beperkt mogelijk houden. Het is onwenselijk hier te noemen dat elk experiment zeer goed wordt voorbereid en alleen wordt uitgevoerd door gecertificeerde onderzoekers, aangezien men er van uit mag gaan dat onderzoekers altijd gecertificeerd zijn en zich zeer zorgvuldig zullen voorbereiden op een experiment. Dit zijn voorwaarden om proefdieronderzoek te mogen doen, en geen maatregelen die een onderzoeker neemt om het ongerief voor de dieren te beperken.

Project Proposal:

-3.1 De laatste 25 jaar is er een enorme hoeveelheid onderzoek verricht om de 'magic bullet' te vinden die zou kunnen beschermen tegen multi-orgaanfalen door sepsis. Historisch gezien heeft dergelijk onderzoek nauwelijks translationele waarde gehad, omdat de positieve bevindingen in een veelheid van diersystemen niet extrapoleerbaar bleken naar de mens. Waarom verwachten de onderzoekers dat in dit specifieke geval hun eventuele resultaten wel translationele waarde zullen hebben? Zijn er voorbeelden beschikbaar waar onderzoek in de muis geleid heeft tot (meer dan ondersteunende) therapie bij dit ziektebeeld in de mens?

-3.1. Kunnen de onderzoekers hier uitgebreider toelichten waarom de hIL37tg muis een goed model is voor de humane situatie? Zij worden verzocht daarbij ook aan te geven wanneer IL37 tot expressie komt in de transgene dieren en in de mens, en op welke receptor het hIL37 in de muizen werkt.

3.4.3 Uit translationeel oogpunt is het logischer om eerst onderdeel B te doen, en alleen bij bewezen effect het werkingsmechanisme uit te zoeken (onderdeel A). Het uitblijven van een therapeutisch effect zou dan een 'no go moment' vormen voor de experimenten met de hIL37tg muis.

Description of Animal Procedures:

-DAP 1.

*B De onderzoekers willen mannelijke muizen gebruiken om 'de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerd AKI te minimaliseren' (of uit te sluiten?). Welke aanwijzingen hebben de onderzoekers dat de hormooncyclus een dergelijk effect kan hebben in deze proefopzet? Kunnen zij een schatting maken van de toename in spreiding indien zij ook vrouwelijke dieren zouden gebruiken en tot welke toename in proefdieraantallen dit zou leiden?

*D, tweede vraag. Temperatuurdaling als gevolg van LPS-injectie ontbreekt in de opsomming (ook bij onderdeel I). De commissie denkt dat het goed zou zijn om hier ook de mogelijke maatregelen te bespreken om de welzijnsgevolgen van de temperatuurdaling te beperken (bijvoorbeeld een couveuse). Als daar van af wordt gezien, dan zou ook vermeld moeten worden waarom dergelijke maatregelen niet mogelijk zijn.

*J. De onderzoekers worden verzocht de humane eindpunten preciezer te formuleren, en de geschatte incidentie getalsmatig (bijvoorbeeld als percentage) uit te drukken.

*K. Het percentage van de dieren dat respectievelijk ernstig, matig of licht ongerief zal ondergaan is niet gegeven.

-DAP2

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en dit aan te passen.

*A. Het ziektebeloop van de muizen in groep 2-3 en groep 2-2 zal worden vergeleken met het ziektebeloop van de muizen in groep 2-1. Waartoe dienen de drie vehicle groepen en waarom zijn daar ook 15 dieren per groep voor nodig?

- Datum antwoord: 22-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-(3.5) In het beschreven project zullen enkele groepen proefdieren worden blootgesteld aan moderate of ernstig ongerief. De verwachting is dat de wild type muizen ernstig ongerief zullen ondervinden (ongeveer 40%), terwijl de transgene muis welke IL37 tot expressie brengt matig ongerief zal ondervinden (ongeveer 40%). De controle groepen zullen slechts mild ongerief krijgen, aangezien deze geen sepsis zullen ontwikkelen (ongeveer 20%).

-(4.2) Het minimum aantal muizen wat is benodigd per experimentele groep om mogelijke verschillen tussen groepen aan te tonen is berekend aan de hand van resultaten uit reeds beschreven studies uit de literatuur. Door deze gegevens te gebruiken voor het opzetten van de huidige studie wordt voorkomen dat onnodig teveel dieren worden geïncubeerd per experimentele groep. Het op deze manier berekende totaal aantal benodigde dieren is 240 muizen (zie 3.3).

-(4.4) Om de negatieve gevolgen van het ontstaan van bloedvergiftiging te beperken zullen de muizen in een verwarmde omgeving worden gezet, zodat de lichaamstemperatuur beter op peil kan worden gehouden. Tevens wordt gezorgd voor een vergemakkelijkt aanbod van drinkwater en voer (gebruik van verlengde spuitmond van drinkfles en papvoer in kooi), waardoor de toegankelijkheid geoptimaliseerd is. Daarnaast zullen de negatieve gevolgen van een experiment zeer strikt worden beschreven en gecontroleerd door zowel de onderzoeker als medewerkers van het dierenlaboratorium. Mochten de negatieve gevolgen voor de dieren groter zijn dan de beschreven verwachte gevolgen, zal er actie ondernomen worden waarbij het dier geofferd wordt.

Project Proposal:

-(3.1) Wij onderschrijven dat met name in dit onderzoeksveld meerdere therapeutische strategieën die veelbelovend leken op basis van proefdieronderzoek niet werkzaam bleken bij de mens. Wij verwachten ook niet de 'magic bullet' te vinden die multi-orgaanfalen bij sepsis kan voorkomen. Echter, gezien de frequentie en ernst van het ziektebeeld zijn ook kleinere bijdragen aan een betere prognose en/of therapie voor deze patiënten meer dan welkom. Wij kunnen ons niet goed voorstellen hoe wetenschappelijke en medische vooruitgang kan worden geboekt zonder potentiële therapeutische strategieën uit te testen in proefdiermodellen.

Enkele voorbeelden van de afgelopen jaren waarbij onderzoek op dit gebied bij muizen/ratten heeft geleid tot toepassingen bij de mens zijn het beschermend effect van alkalisch fosfatase op sepsisgeïnduceerd acuut nierfalen (Pickkers P et al. Crit Care 2012), en het gunstig effect van interferon-beta-1a op ARDS (Bellingan G et al. Lancet Respir Med 2014).

Recent is een sterke focus ontstaan op de ontrafeling van cascades behorende tot het aangeboren immuunsysteem, en de rol daarvan in de pathofysiologie van sepsis.

Fundamenteel en preklinisch onderzoek heeft uitgewezen dat onder andere toll-like receptoren (TLR2 en TLR4) behorende tot het aangeboren immuunsysteem een belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van sepsis. Meerdere klinische trials zijn momenteel lopende om de effecten van specifieke antagonisten voor receptoren van het aangeboren immuunsysteem te onderzoeken. Zo neemt het [REDACTED] deel aan een multicenter studie naar het effect van een antistof tegen TLR2 bij ischemie-reperfusie schade na niertransplantatie. Een belangrijke conclusie die wordt getrokken uit de resultaten van afgeronde studies is dat de blokkade van één specifieke receptor-ligand interactie hoogstwaarschijnlijk niet afdoende blijkt om de gehele pathofysiologie van sepsis en nierfalen te kunnen remmen/voorkomen. In het huidige project focussen wij op het anti-inflammatoire cytokine Interleukine-37, wat een algemene remmer is van het aangeboren immuunsysteem. De werking van IL37 is niet gericht tegen één specifieke receptor, maar remt verschillende immunologische signaleringscascades, waaronder die van TLR2, TLR4 en TLR9 (Nold MF et al. Nat Immunol 2010). Daarnaast is gebleken dat de transgene expressie van IL37 een beschermende werking geeft tegen het ontwikkelen van sepsis bij de muis (Nold MF et al. Nat Immunol 2010), zonder dat daarbij specifiek is gekeken naar het effect op de nier en het ontstaan van acuut nierfalen. Onze hypothese is dat IL37 een remmende werking heeft op ontstekingsprocessen en daarmee beschermt tegen nierfalen als gevolg van sepsis. Op basis van de belangrijke rol van het aangeboren immuunsysteem in de pathofysiologie van sepsis, de zeer krachtige ontstekingsremmende werking van IL37 in verschillende fundamentele en preklinische studies en het feit dat IL37 een endogeen humaan molecuul is, hopen wij dat de behaalde resultaten van deze studie translationele waarde zullen hebben.

-(3.1) In de mens komt IL37 in vele celtypen tot expressie, waaronder verschillende subtypen immuuncellen (zoals leukocyten en dendritische cellen) alsook in (nier) epitheliale cellen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Basale endogene expressie van IL37 is laag, en wordt pas sterk opgeregeerd door inflammatoire stimuli (Bufler P et al. Biochem J. 2004; Imaeda H et al. Clin Exp Immunol 2013). De ontstekingsremmende werking van IL37 verloopt zowel via intracellulaire cascades die de transcriptie van proinflammatoire genen remmen (door 'endogene' IL37 expressie), als via exogeen IL37 wanneer dit eiwit aanwezig is in het extracellulaire milieu (Bulau AM et al. PNAS 2014). Extracellulair IL37 kan zijn ontstekingsremmende werking uitvoeren door binding aan de alfa-keten van de IL18-receptor (IL18R), in samenwerking met de co-receptor IL1R8 (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015; Li S et al. PNAS 2015). Aangezien er bij de muis geen homoloog van humaan IL37 bekend is, wordt voor de bestudering van de rol van IL37 in vivo gebruik gemaakt van een muis welke transgeen gemaakt is voor humaan IL37 (hIL37tg). Deze hIL37tg muis brengt humaan IL37 constitutief in alle lichaamscellen tot expressie, en vormt zo de basis voor het huidige en reeds verrichte onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van IL37 (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Ondanks dat IL37 expressie gekoppeld is aan de constitutief actieve CMV-promoter in alle transgene cellen, is de basale transcriptie laag en vindt er opregulering plaats door inflammatoire stimuli (Nold et al. Nat Imm 2010). Hierdoor komt de kinetiek van IL37 expressie in deze hIL37tg muis overeen met de humane situatie. Ook voor exogeen toegediend IL37 eiwit is er in een muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waaraan IL37 bindt) (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015). In verschillende experimentele modellen met behulp van

de hIL37tg muis is gebleken dat IL37 een zeer krachtige anti-inflammatoire en beschermende functie heeft in diverse ziekteprocessen, waaronder colitis (McNamee EN et al. PNAS 2011), obesitas (Ballak DB et al. Nat Commun 2014), myocardiaal infarct (Wu B et al. Clin Exp Immunol 2014) en nier ischemie/reperfusie schade (Yang Y et al. Kidney Int 2014). Tevens is met behulp van de hIL37tg muis beschreven dat IL37 expressie een beschermende werking heeft tegen het optreden van LPS-geïnduceerde septische shock, welke leidt tot een sterke reductie van de systemische spiegels van diverse pro-inflammatoire cytokines en verminderde leverfunctiestoornissen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). In deze studie is echter niet gekeken naar de effecten van IL37 expressie op de lokale pathofysiologische consequenties van sepsis in de nier, en ook niet naar de effecten van IL37 op LPS-geïnduceerd AKI.

-(3.4.3) Er zal worden begonnen met het uitvoeren van deexperiment A, gevolgd door deexperiment B. De resultaten uit deexperiment A zullen niet de opzet van deexperiment B beïnvloeden, aangezien in beide deexperimenten naar verschillende vormen van IL37 eiwit gekeken wordt (in deexperiment A kijken we naar de rol van endogeen IL37 expressie; in deexperiment B kijken we naar het effect van toegediend exogeen IL37 eiwit). Uit een recente studie is gebleken dat endogene IL37 expressie een beschermend effect geeft op het ontwikkelen van sepsis (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Hierdoor is naar onze verwachting deexperiment A optimaal om de werking van endogeen IL37 in het ontstaan van AKI als gevolg van sepsis te bestuderen. Extracellulair IL37 kan additieve effecten hebben bovenop de rol van endogeen IL37. Dit blijkt uit het feit dat het voorbehandelen van hIL37tg muizen met IL37-blokkerende antilichamen een geneutraliseerd effect geeft na LPS toediening (Bulau AM et al. PNAS 2014). Het uitblijven van een eventueel therapeutisch effect van exogene IL37 toediening in deexperiment B hoeft dus niet te betekenen dat er geen functie en/of rol is voor endogene IL37 expressie in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens sepsis (deexperiment A). Wanneer er wel een effect gevonden wordt van endogene IL37 expressie (doel van deexperiment A) kan dit namelijk aanleiding geven tot vervolgstudies waarin getracht wordt om het endogene expressie niveau van IL37 te moduleren, om zodoende bescherming te bieden tegen sepsis-gemedieerd AKI. Naar ons idee hoeven de resultaten van beide deexperimenten elkaar dus niet te blokkeren.

Description of Animal Procedures:

Bijlage 1 (DAP1)

-(B) In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerde AKI uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexe-verschillen zijn in de immunologische respons tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK et al. Virulence 2014; Marriott I et al. Immunologic Research 2006; Marriott I et al. Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M et al. Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen we niet goed inschatten. Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te

herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.

-(D 2e vraag; en I) Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: daling van de lichaamstemperatuur, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). Ter verlichting van het ongerief zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven. Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere spuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende verschillende typen uitleesparameters te onderzoeken (acute fase, latere functionele fase).

Deze vermelding van daling in lichaamstemperatuur als gevolg van sepsis en het gebruik van warmtematjes ter verlichting van het ongerief is tevens opgenomen onder onderdeel I.

-(J-2): De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-Te hoge totaal score (≥ 5) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijns-scoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48uur in het experiment.

-(J-3): De verwachte incidentie in WT muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in de hIL37tg muizen is 0-5%.

-(K) De mate van ongerief in de experimentele groepen welke LPS injecties krijgen is ingeschat als ernstig. Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien deze het gevolg is van het induceren van sepsis door middel van LPS injecties.

Aan de hand van de hypothese wordt in de hIL37tg muisgroep (40%) een matig niveau van ongerief verwacht ten opzichte van de wild type controle muizen (ernstig; 40%).

De mate van ongerief in de controle groepen wordt ingeschat als mild (20%), aangezien deze muizen geen sepsis zullen ontwikkelen.

Bijlage 2 (DAP2):

- Ook voor DAP2 zijn de velden aangepast met betrekking tot 'gekozen sexe' (B), 'welzijnsgevolgen' (D-2 en I), 'humaan eindpunt en incidentie' (J-2/3) en (K).

-(A) De groepen 1-1 (vehicle+saline), 1-2 (vehicle+recombinant IL37) en 1-3 (vehicle+ EPO) dienen ervoor om de individuele basale effecten van het toegediende IL37 en EPO te karakteriseren. De toegediende componenten kunnen namelijk al een basaal effect teweeg brengen op bijvoorbeeld functionele parameters en/of inflammatoire markers (gen expressie

levels en/of basale cytokine waarden, infiltratie van inflammatoire cellen in nierweefsel). Om een gedegen uitspraak te kunnen doen over de effectieve (beschermende) gevolgen van recombinant IL37 en/of EPO toediening tijdens het ontwikkelen van sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, dienen we ook deze basale effecten in kaart te brengen. IL37 en EPO signaleren en functioneren beiden via andere signaleringscascades, zodat het niet mogelijk is om deze te combineren in één controlegroep. Groep 1-1 fungeert als de basale controle groep.

Naar onze inschatting zal er in de 3 controle groepen minder spreiding in de uitleesparameters optreden in vergelijking met de resultaten afkomstig uit groepen 2-1, 2-2 en 2-3, welke wel sepsis ontwikkelen. We hebben daarom een wijziging doorgevoerd zodat we voor deze controle groepen in plaats van 15 maximaal 10 muizen/groep benodigd denken te hebben. Deze veranderingen zijn doorgevoerd in (3-1), (K-1) en 'Table:Animals'.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum:13-10-2015

- Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting

-Het aantal muizen is aangepast in de bijlagen, maar nog niet in de NTS. De onderzoekers worden verzocht dit alsnog te doen.

- Datum antwoord: 15-10-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet technische-samenvatting:

-Naar aanleiding van deze opmerking zijn voor zowel paragraaf (3.3) en (4.2) in de NTS de wijzigingen doorgevoerd, en zodoende de correcte hoeveelheid te gebruiken muizen weergegeven (n=225 muizen totaal; n=75 muizen in deelproject B).

- 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 'het bestuderen van de functionele contributie en de therapeutische potentie van het ontstekingsremmend eiwit IL37 in sepsis-gemedieerd AKI.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de rol is van endogeen IL37 tijdens sepsis en het daaropvolgend acuut nierfalen bij muizen. Voorts zal duidelijk worden of toediening van IL37 (dus exogeen IL37) de nierschade door sepsis bij muizen kan verminderen. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Acuut nierfalen komt frequent voor bij mensen die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en wordt voornamelijk veroorzaakt door sepsis. Het is aannemelijk dat meer inzicht in de moleculaire en cellulaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van acuut nierfalen door sepsis bij muizen zal bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische interventies. De commissie heeft gediscussieerd over de predictieve validiteit van het gebruikte model. De antwoorden van de onderzoeker op de vragen die de commissie hierover heeft gesteld, hebben de commissie voldoende overtuigd. Op dit moment is er geen effectieve behandeling van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, waardoor de helft van de patiënten hier op korte of langere termijn aan overlijdt. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor sepsis-gemedieerd nierfalen, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.
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 de functie van IL37 in moleculaire en cellulaire mechanismen tijdens sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, en het effect van toediening van IL37 ter preventie van acuut nierfalen door sepsis bij muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gevolgen van de intraperitoneale injectie van LPS. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde i.p. of s.c. injecties en het doden onder anesthesie in als licht. Het ongerief als gevolg van de LPS injectie en daarop volgende systemische afweerreactie schat de DEC in als matig voor de muizen die transgeen zijn voor humaan IL37, en ernstig voor de wildtype dieren. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 27% van de dieren, matig voor 40% van de dieren en ernstig voor de overige 33% van de 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. De onderdelen van dit project die in vitro onderzocht kunnen worden zijn reeds uitgevoerd. Voor de resterende onderdelen is onderzoek met dieren noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het verminderen van het aantal dieren in de controlegroepen, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 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. Er wordt adequate invulling gegeven aan de extra verzorgingsbehoefte van de zieke dieren. Op verzoek van de commissie krijgen de zieke dieren ook de mogelijkheid op een verwarmde ondergrond te verblijven. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de bijdrage van IL37 in de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, en in het effect van toediening van IL37 ter preventie van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen bij muizen. Op termijn kunnen deze inzichten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Het belang van deze wetenschappelijke inzichten en de ontwikkeling van therapieën voor sepsis-gemedieerd acuut nierfalen acht de DEC substantieel, gezien het frequent optreden van acuut nierfalen door sepsis bij patiënten die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en de ernst van deze complicatie.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 27% van de dieren licht ongerief, 40% van de dieren matig ongerief en 33% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het sepsismodel 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 onder de volgende voorwaarden
 - o Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.