

Inventaris Wob-verzoek W16-09S									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015321</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling I				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling I				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling II				x		x	x	
10	Mail DEC vragen				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling II				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

24 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg 4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	

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

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- 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 | 01 - 12 - 2015 |
| Einddatum  | 01 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het ontwikkelen van nieuwe therapieën/behandelingsmethoden om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC-UM                                    |
| Postadres   | Postbus 616 [redacted] 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | [redacted]                                |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 468,00  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondertekende 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	[Redacted]	
Functie	[Redacted]	
Plaats	Maastricht	[Redacted]
Datum	18-11-2015	[Redacted]
Handtekening	[Redacted]	





## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

#### Preterm birth

Preterm birth, defined as birth before 37 weeks of gestation, is the leading cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries (1). Survival after preterm birth has sharply increased in the last decades (2). This positive trend can be largely contributed to reduction of early pulmonary complications, which has been established by widespread use of antepartum corticosteroids, postpartum surfactant administration and the development of improved ventilation strategies (2, 3). Unfortunately, preterm birth is still associated with mortality and long-term morbidity, despite the mentioned improvements in perinatal care. Given the magnitude of the problem of preterm birth, such a large scale health care challenge also forms a tremendous economic burden on society. The most important causes leading to preterm birth can be roughly divided in two major groups: intrauterine infection (chorioamnionitis) and fetal hypoxia-ischemia. In this study we will test new therapeutic interventions after fetal hypoxia-ischemia.

### **Hypoxic-ischemia**

Fetal hypoxia-ischemia (HI) is a severe condition and defined as a period of insufficient blood gas exchange leading to progressive hypoxia, hypercapnia, metabolic and/or respiratory acidosis and eventually ischemia resulting from a disturbed fetal-maternal circulation (1).

HI affects different organ systems. However, due to its high metabolic rate and energy need, the brain is one of the most vulnerable organs with limited regenerative capacity and HI can cause severe hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). Despite the high prevalence of neurological sequelae, therapeutic options to improve the neurodevelopmental outcome in **preterm** infants after HIE are unavailable. In mild cases of HIE in **term** infants whole body cooling therapy has been shown to improve neurodevelopmental outcomes. Cooling therapy is an independent risk factor for adverse neurological outcomes in **preterm** infants and therefore is not standard clinical care for this vulnerable patient group, indicating the demand for new therapeutic options for this vulnerable patient group.

In the last decade, stem cell therapy has emerged as a putative treatment for neonatal ischemic injury (27). Bone marrow-derived stromal cells (MSC) have great therapeutic potential in the field of neonatal regenerative medicine due to their immune modulatory and regenerative capacities (28). The immune modulatory effects of MSCs consist of modulation of both innate and adaptive immunity in favor of anti-inflammatory properties (28, 29). Therefore, MSCs have been studied as therapeutic intervention in many neonatal diseases in which inflammation or pathogenic immune responses play a key role in pathophysiology including bronchopulmonary dysplasia and brain injury (27). Although the exact mechanisms remain largely unknown, general consensus is that MSC-mediated immunomodulation is predominantly caused by the **paracrine effect** mediated by soluble factors secreted by MSCs (28). This concept is the motivation to move towards a new treatment of preterm babies with cell preparations or cell free excretions of highly specified stem-cell populations. Our concept will identify mechanisms and proof efficacy which will form the basis for the subsequent choice of stem cells that are then tested against cell-free preparations of **secreted extracellular vesicles (EV)** from bone marrow derived stromal cells. The effectiveness of such a preparation is the current limit of knowledge which we intend to test. The treatment with secreted vesicles rather than livable stem cells is a simplification of treatment which would make the move into clinical trials for the benefit of patients much faster and easier since concerns of immunogenic compatibility and cell fate need not to be addressed.

Previously we have demonstrated that bone marrow-derived stromal cells are effective for the treatment of HI-induced injury of the preterm brain (30, 31). Based on the results of, amongst others, this study we postulate that the protective effects of cell-based therapies are **spleen-mediated**; splenic immune cells migrate towards the brain after global HI. Stem cells alter the composition and (re)activity of splenic immune cells (both innate and adaptive) and prevent their migration towards the brain (30-32).

In order to improve our current therapeutic approach, we aim to further explore the splenic response towards the brain after HI and/or cell-based therapies.

Besides brain injury, fetuses which suffered from global hypoxia-ischemia are at high risk to develop adverse clinical outcomes of the fetal intestine such as feeding intolerance, altered intestinal motility (33) and necrotizing enterocolitis (NEC) (34), the most severe, life threatening gastrointestinal pathology in preterm neonates. Intestinal hypoxia-ischemia leads to impaired barrier epithelial integrity and delayed gastrointestinal transit (unpublished data). This is a relative new concept of so called gut-brain axis which describes the link between brain innervation of the gut and function of the gut. In order to evaluate gut function, a sugar-based permeability test will be performed. A solution composed of small (evaluate intracellular passage) and a large (evaluate paracellular passage) sugar probes will be infused into the stomach of the fetuses by gastric tube and the concentration of the large/small sugars will be measured non-invasively *in vivo*, in plasma to assess changes in gastrointestinal permeability between the groups. The motility of gastrointestinal tract will be assessed by evaluating the distribution of rhodamine-B-labeled in the bowel of the fetuses. Rhodamine will be infused into the stomach of fetuses by gastric tube and differences in the rhodamine-containing gut content between the groups will be quantified at sacrifice.

### 3.2 Purpose

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

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

The **main purpose** of this research project is to improve perinatal management by developing novel therapeutic strategies to improve neurological outcomes.

#### Improve structural and functional brain injury with cell-based therapy

**AIM a:** To assess the temporal dynamics of the cerebral and peripheral immune response in the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury.

**AIM b:** To assess the role of the spleen in the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury.

**AIM c:** To test intravenous administration of cell-based therapies from different sources: bone marrow-derived stromal cells, cell-free preparations of bone marrow-derived stromal cells, preconditioned stem cell preparations for their effectiveness in reducing hypoxic-ischemic brain injury.

**AIM d:** Define the optimal dosing strategy for the most effective cell-based therapy.

**AIM e:** Assess long-term effects of cell-based therapies on neurodevelopmental outcomes.

### 3.3 Relevance

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

#### General relevance:

Preterm birth is the leading cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries. In the Netherlands. Although survival after preterm birth has increased in the last decades, still a large proportion of preterm infants suffer from long term morbidity and disability, which have a tremendous impact on patients and their families.

#### Epidemiology:

Preterm birth: 13649 (7,7% or 77 per 1000 live and dead born children)

Of the 13649 preterm infants, 1148 infants died due to preterm birth alone or complications of preterm birth (e.g. asphyxia, respiratory insufficiency)

Extreme preterm: 2637 (20% of preterms) of whom 1/3 dies; 1/3 survives with handicap and 1/3 survives without morbidity.

In 25-40% of preterm births are caused by intra-uterine inflammation (chorioamnionitis).

Gestational age (weeks)	Live and dead born	
	number	percentage
22-24	630	0,4
25-31	2.007	1,1
32-36	11.012	6,2
≥ 37	162.625	91,5
unknown	1.439	0,8
<b>Total</b>	<b>177.713</b>	<b>100,0</b>

#### Primary endpoint Brain:

Cognitive, socialization, attentional and/or behavioral disorders: 25-50% of preterm infants

Spastic motor deficits (e.g. cerebral palsy): 5-10% of preterm infants

#### Secondary endpoint Gut:

Necrotizing enterocolitis: 10-20% of preterm infants

We will conduct relevant experiments in preclinical/translational animal models in order to improve the outcome of this highly susceptible patient group by addressing different approaches:

#### Cell-based therapies

Cell-based therapies (1) are immune modulating and (2) stimulate regenerative processes. Key process in development of preterm lung and brain injury is inflammation.

1. Cell-based therapies will **reduce inflammation**, thereby preventing its detrimental effects on fetal development
2. Injury to the lungs and brain often is already present before start of therapy. Since cell-based therapies also have **regenerative properties**, this initial damage might be restored.

Cell-based therapies, therefore, prevent continuation of detrimental processes and restore existing injury.

Moreover, transplantation of living cells (bone marrow-derived stromal cells and their derivatives) has proven safe with respect to malignant transformation and is currently being tested in human (adult) clinical studies for other diseases (e.g. graft versus host disease, stroke, inflammatory bowel disease). Furthermore, the use of stem cells derivatives (e.g. extracellular vesicles) evades this risk since these biological active vesicles are non-self-replicating. However, back-to-back comparisons with living cells remain crucial.

### 3.4 Research strategy

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

In the current project we have formulated the aim to develop and improve new therapeutic strategies for the treatment of perinatal insults in well-established ovine model of global hypoxia-ischemia (HI).

Ovine fetal development, in terms of white matter development in the brain, is comparable to human fetal development: both processes start prenatally and continue postnatally, whereas these processes start postnatally in rodents (figure1).

Moreover, the size of the ovine fetus allows for chronic *in utero* instrumentation for hypoxia-ischemia model. In addition, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes.

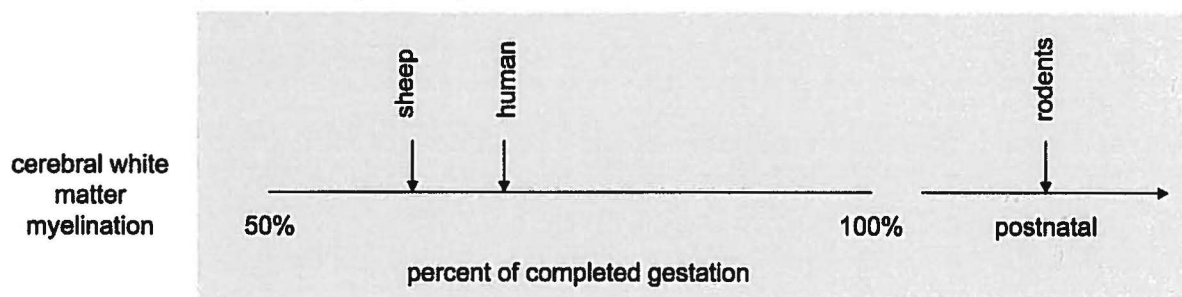


Figure 1 Brain development during gestation in humans, sheep and rodents.

The objective of this project is to develop novel treatment strategies to reduce the neurodevelopmental sequelae of the most common underlying pathology in preterm birth complicated by asphyxia. For this purpose, we generated the following main research question in this project:

**Global hypoxia-ischemia:**



Is cell-based therapy effective in reducing injury of the preterm brain caused by asphyxia?

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.

#### **Global hypoxia-ischemia**

Preterm ovine fetuses are chronically instrumented and subsequently subjected to *in utero* hypoxia-ischemia and intravenous administration of cell-based therapeutics at predetermined time-points. The gestational age of the fetus at occlusion is determined previously and correlated to the gestational age at which human fetuses are most vulnerable to brain injury caused by pre- and perinatal adverse events (figure 1) (36).

The primary outcome of this study is structural and functional brain injury. Secondary outcomes are brain inflammation, immune modulation, and function and injury of lungs and gastro-intestinal tract.

We have chosen Texel sheep for the following reasons:

1. In the current proposal, all lambs are born preterm through surgical delivery (Caesarean section), thereby, avoiding the risk of spontaneous labor. Therefore, parturition is not the focus of the experiments.
2. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.

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.

The objective of this project is to develop therapeutic strategies to reduce the consequences of hypoxia-ischemia and brain injury of these threats and improve outcome in preterm infants.

In the model of HI we seek to improve structural and functional brain injury with cell-based therapy. Previous studies of our group have indicated that cerebral and peripheral inflammatory responses play a crucial role in the etiology of hypoxic-ischemic brain injury. However the temporal dynamics of these responses require further elucidation (**AIM a**). AIM a will be a milestone in the understanding of the dynamics of HI brain injury, and will provide more insight into timepoints at which cell-based therapies should be administered.

The spleen is considered a key immunological organ contributing to brain injury by providing immune effector cells that invade the brain. We therefore postulate that cell-based interventions should modulate this splenic inflammatory response. Splenectomy will enable us to study the contribution of the splenic inflammatory response in the etiology of hypoxic-ischemic brain injury, which would be a milestone in understanding the pathophysiology (**AIM b**). Moreover, we will compare the effects of splenectomy to administration of Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC), as subset of mesenchymal stromal cells that have previously been shown to modulate neuroinflammation through interactions with splenic immune cells in adults. AIM b will be a milestone a milestone and a go or no go. If the splenic involvement cannot be demonstrated in our study, we will pursue other targets (need to be determined on the basis of the

experiment), but we will not continue targeting the spleen with cell-based therapies.

We will test clinical-grade stem cells or biological preparations derived from these cells (e.g. microvesicles and preconditioned cells) for their effectiveness in reducing in the preterm brain after asphyxia (**AIM c**). AIM c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM b. However, if cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.

Improving functional and structural outcome of the preterm brain after asphyxia is a huge milestone in neonatal medicine creating a chance to improve the neurodevelopmental outcome of many preterms. Subsequently optimal dosing strategy (**AIM d**) and long-term treatment effects (**AIM e**) will be determined.

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

**AIM a** will be a milestone in the understanding of the dynamics of HI brain injury, and will provide more insight into time points at which cell-based therapies should be administered.

**AIM b** will be a milestone and a go or no go. If the splenic involvement cannot be demonstrated in our study, we will pursue other targets (need to be determined on the basis of the experiment), but we will not continue targeting the spleen with cell-based therapies.

**AIM c** will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM B. However, if cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.

**AIM d** will be a milestone in determining the optimal dosing strategy that will be tested for long term effects in **AIM e**.

If our cell-based therapy has long-term effectiveness (**AIM e**), this will be a major milestone for future experiments and clinical trials.

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	Global hypoxia-ischemia
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Global hypoxia-ischemia

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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.

Ovine fetuses will be chronically instrumented. After a four day recovery period the fetuses are subjected to 25 minutes of (sham) umbilical cord occlusion. After occlusion the fetus will receive an intravenous bolus of cell-based therapy. During the entire experiment electrophysiological and hemodynamic recordings are made continuously.

We have formulated the following experiments and experimental designs:

**Table 1 Experimental groups**

Aim	Nr. groups	sham/HI	Experimental condition	Cell-based therapy	N	Total N
1a	6	sham	1 day		N=12	N=60
			3 days		N=12	
			7 days		N=6	
		HI	1 day		N=12	
			3 days		N=12	
			7 days		N=6	
1b	8	sham	SPLX	saline	N=12	N=96
				MARC	N=12	
			Sham SPLX	saline	N=12	



				MAPC	N=12	
		HI	SPLX	saline	N=12	
				MAPC	N=12	
		HI	Sham SPLX	saline	N=12	
				MAPC	N=12	
1c	12	sham		saline	N=6	N=108
				MSC	N=6	
				MSC-EV	N=12	
				MAPC	N=6	
				MAPC-EV	N=12	
			preconditioned	N=12		
		HI		saline	N=6	
				MSC	N=6	
				MSC-EV	N=12	
				MAPC	N=6	
	MAPC-EV		N=12			
		preconditioned	N=12			
1d	10	sham	saline	N=6	N=108	
			Superior therapy	Dose 1, timing 1		N=12
			Superior therapy	Dose 1, timing 2		N=12
			Superior therapy	Dose 2, timing 1		N=12
			Superior therapy	Dose 2, timing 2		N=12
		HI	saline	N=6		
			Superior therapy	Dose 1, timing 1		N=12
			Superior therapy	Dose 1, timing 2		N=12
			Superior therapy	Dose 2, timing 1		N=12
			Superior therapy	Dose 2, timing 2		N=12
1e	4	sham	saline	N=12	N=48	
			Superior therapy	N=12		
		HI	saline	N=12		
			Superior therapy	N=12		
SPLX = splenectomy; MSC = mesenchymal stem cells; EV = extracellular vesicles						<b>N=420</b>

**Primary outcomes:**

1. Structural brain injury (determined post-mortem with MRI and immunohistochemistry)
2. Brain function (analysis of electro graphical data)

**Secondary outcomes:**

1. Brain inflammation
2. Immune activation
3. Function and injury of the gastro-intestinal tract

Ovine fetuses are the most appropriate animals to address our hypotheses for a number of reasons:

1. Ovine neurodevelopment is comparable to human neurodevelopment in terms of white matter myelination; myelination starts prenatal in humans and sheep compared to rodent in which myelination starts postnatally.
2. Preterm lambs (106 days gestational age , ~30 weeks human neurodevelopment) are large enough to perform chronic instrumentations which allow the investigator to perform continuous

measurements in vital parameters throughout gestation.

The long gestational period (~147 days) allows for close investigation of specific developmental processes.

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

Fetuses of time-mated Texel ewes (102 days gestational age) will be **chronically instrumented** under strict sterile conditions: under general anesthesia the fetus will be exposed through a median laparotomy. While remaining on placental circulation an arterial catheter for blood pressure measurements and blood sampling, a venous catheter for administration of therapeutics and ECG electrodes for cardiac monitoring are placed. EEG electrodes are placed on the dura to monitor brain activity and seizures. An inflatable vascular occluder is placed around the umbilical cord to induce transient global hypoxia-ischemia. The fetal spleen is removed in 10-20% (AIM 1b) of the animals through a subcostal incision. A gastric tube is placed (oral) for studies of gastro-intestinal absorption and motility. The fetus is placed back in utero and upon closure of the uterus a catheter is placed in the amniotic cavity for pressure recordings. All catheters and leads are exteriorized through a trocar hole in the flank of the ewe.

After a 4 day recovery period the fetuses are subjected to **25 minutes of umbilical cord occlusion** (106 days gestational age) by rapid inflation of the vascular occluder. After occlusion a **reperfusion period** will follow of maximal 30 days while the fetus will remain in utero during which **cell-based therapy** is administered intravenously (maximal 2 repeated dosages). Moreover, arterial blood samples are taken (maximal 1 sample per 48 hours). 24 hours before the end of the experiment rhodamine-labelled dextran is given through the gastric tube for post-mortem evaluations of gastro-intestinal absorption and motility. At the end of the experiment, the ewe and the fetus will be euthanized (intravenous pentobarbital, simultaneously), followed by C-section and tissue sampling for *ex vivo* analysis.

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

In previous experiments on hypoxia-ischemia and cell-based therapies in ovine fetuses we have successfully used group-numbers of 6-8 animals (Jellema et al., 2013a, 2013b, 2013c). **We found a reduction of convulsion as improvement of brain function by more than 40% with a standard deviation of 30%.**

**Based on these data, with a power ( $n$ ) of 80% and an alpha of 0.05, significant different structural changes and functional changes between the control and experimental groups of 40% ( $\delta=40$ ) with a Standard deviation of 30% ( $\sigma=30$ ) can be detected with a sample size of 9 ( $n = 15.7 * (30/40)^2 = 8.83$ ) (L. Sachs)**

We take into account a loss of 25% of the animals due to complications of fetal instrumentation and umbilical cord occlusion. Therefore the total number of animals per experimental groups will be 12 (a - 0.25a = 9; .075a = 9; a = 12).

Since some groups will be repeated throughout all aims, we will, if supplementing with historical controls is possible, not repeat these experiments, but limit our animal number to 6. We have to repeat control

experiments to be able to correct for differences between breeding seasons (personal communication: differences in outcome parameters were detected between different breeding seasons).

## B. The animals

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

This experiment will be performed with a maximum of **420** pregnant sheep and maximally **420** of their respective singleton fetuses (> 2/3 gestation). We have planned 5 individual experiments (AIMS 1a-e) which will follow in logical order and which implementation is dependent on the results of previous experiments ("milestones"). Group sizes have been calculated with the formula of Sachs in which structural brain injury and brain function (obtained from previous experiments) were primary outcome parameters.

The sheep used in this study are bred by a highly experienced farmer who also breeds for other sheep experiments. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

We have chosen Texel sheep for the following reasons:

1. In the current proposal, all lambs are born preterm through surgical delivery (Caesarean section), thereby, avoiding the risk of spontaneous labor. Therefore, parturition is not the focus of the experiments.
2. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## D. Replacement, reduction, refinement

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

**Replacement:** These animal experiments cannot be performed otherwise since:

1. We aim to mimic the clinic as much as possible in order to make an easy translation towards clinical application.
2. The pathophysiology of global hypoxia-ischemia involves complex interplay between different organ

systems connected to each other by the vascular and nervous system. This interplay cannot be mimicked outside the body.

3. We give a systemic therapy which will engage multiple facets of the pathophysiology of global hypoxia-ischemia.

We intend to perform these experiments in sheep since:

1. Ovine prenatal organ development (lung, brain and gut) closely mimics human organ development compared to rodents.
2. The long gestational period of sheep (~147 days) allows for more detailed and better timed studies of developmental processes during gestation compared to rodents.
3. The relative large size of sheep allows for chronic instrumentation and (electro) physiological monitoring of vital clinical relevant functions during gestation.

#### **Reduction:**

We strive to minimize the number of animals used in the proposed study as follows:

1. We will complement control groups with historical controls in order to prevent repetition of experiments.
2. Based on the go's and no go's and milestones we will reduce the number of cell-based therapies, and therefore animal numbers, in experiments 4 and 5.
3. The addition of gut-function as an additional functional read-out for our cell-based interventions will prevent the use of additional animals for gut motility and absorption purposes only and reduces the overall number of animals, without increasing discomfort.

**Refinement:** It is vital that the sheep are housed solitary in a confined space since the catheters and leads that exit the ewe's flank are connected to monitoring equipment and infusion pumps. Solitary housing will prevent that other animals can gnaw through the vascular catheters (personal experience) and cause early termination of the experiment (human endpoint). However, the sheep will be within auditory, visual and olfactory reach of other sheep. Moreover, behavioral observation and cortisol measurements have determined that this type of housing is well tolerated by the sheep and does not induce significant stress.

The stress for sheep has been assessed in different manners like hormone (cortisol), heart rate, breathing rate, blood pressure, behavior and food intake - among which the cortisol level has been relatively reliable as an indicator of stress. Other indicators of stress depend on the time of the day, environment and facilities. Keeping the sheep in groups rather than alone is the most important prevention of stress in this species which is consistently done at the facilities in Maastricht. Stress is in addition a confounding factor in our experiments which we want to avoid at all costs. Given our experience with the models and the expertise in the facility in Maastricht, we are convinced that the stress level is kept to a minimum.

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

#### **Ewe**

Before instrumentation-surgery the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. During the experiment the sheep will be kept within visual, auditory and olfactory range of other sheep and will have a normal day-night cycle.

The sheep will be checked daily for discomfort due to surgery and hypoxia-ischemia. Discomfort is described in the humane endpoint section. Post-operative antibiotics and analgesia will be administered in order to prevent (wound) infection and pain. All wounds are assessed and, if necessary, treated with antiseptic wound spray daily.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

### **Fetus**

All sedation that is administered to the ewe is able to cross the placental barrier. Therefore, the fetus is also sedated during surgery. Upon closure of the uterus, a bolus of antibiotics is administered into the amniotic cavity in order to prevent *in utero* infection.

## **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.

For this project repetition of previously performed experiments is necessary for the following reasons: Previous studies of our group indicated that cell-based therapy may be a promising candidate to treat injury in the preterm brain. In the proposed experiments we will study the pathophysiology of this injury in further detail by adding new techniques (e.g. splenectomy) which have not been performed before. Furthermore we will test different cell-based therapies which have more potent anti-inflammatory and regenerative properties *in vitro* than the stem cells previously tested.

## **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

No

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

The sheep are housed in a confined space with limited room for movement in order to prevent fetal loss due to injury to the externalized fetal leads and catheters, which are connected to monitoring equipment and infusion pumps. However, the sheep will be housed near other sheep in olfactory, visual and auditory distance. This practice has been done successfully and has been evaluated for maternal stress hormones which appear to be low.

### **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.

Sheep will be operated under full-anaesthesia. Post-operatively they will receive analgesia.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. The ewe can experience post-operative wound infection
2. After surgery the sheep are placed in confined solitary housing
3. The sheep can go into preterm labour

Explain why these effects may emerge.

Although the sheep are operated on aseptically and have a permanent wound on the abdominal wall through which catheters and leads are exteriorized the chance for post-operative infection is small (personal experience). However, the sheep defecate in their own pen which always poses a risk for infection.

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

1. Sheep receive prophylactic antibiotics which are continued post-operatively for 5 days and longer if necessary. Moreover, the wounds are inspected and treated daily with chlorotetraspray. Moreover, the pen is cleaned daily.
2. Although the sheep are placed in solitary confined housing they are within auditory, visual and olfactory distance of other sheep.
3. Preterm labor cannot be prevented but is (based on experience) a very rare event. Moreover, preterm labor is a humane endpoint.

The fetus displays an acute physiological reaction illustrative of discomfort during and after asphyxia. However, due to a continuous "dormant" status of the fetal brain during gestation, the fetus is not aware of discomfort and will not experience it as such (1).

Opioids will affect receptors that are activated by different stimuli such as pain. In the disease situation of hypoxia-ischemia an abrupt shortage of oxygen and blood supply occurs. This occurs in a very immature fetus which has not yet developed the neuronal links of responding to such a shortage of blood



and oxygen which is shown by the responses of the cardiovascular system. The neuronal system lacks the perception and response mechanisms due to immaturity.

#### **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.

##### **Humane endpoints for ewes:**

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

The sheep receive post-operative pain medication. If a sheep does not respond to the maximum amount of pain medication within 24 hours, we consider the pain to be untreatable and define this as a human end-point.

2. Infection: The animals will be monitored via analyses of blood (pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, base excess, lactate, glucose, Hb, Ht, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub> saturation) and vital parameters (temperature, ECG, blood pressure). However, instant analysis of blood for cellular components is not possible. Therefore, we need to rely on clinical parameters described below:
  - o Local (site of surgical wound): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
  - o Systemic: Elevation of the body-temperature, elevation of the heart-rate, lethargy, excessive time lying down.
3. Intra-uterine fetal death: Fetal death can be determined by evaluation of the fetal ECG, blood-pressure, and blood gas analysis
4. Pending labor: A sheep showing behaviour of pending labor will be taken out of the experiment
5. Abdominal hernia: Abdominal hernia will be assessed by palpation of the abdominal wound. When an abdominal hernia is determined, the sheep will be euthanized.

##### **Humane endpoints for fetus:**

Persistent bradycardia of less than 30 beats/min and a lactic acidosis with a pH<6.8 over a period of 6 h not responding to fluid treatment

Indicate the likely incidence.

Based on previous experiments we have determined the incidence of reaching a human endpoint at 10%, which is mostly determined by *in utero* fetal death.

#### **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').

Ewe: Severe

The ewe will undergo abdominal surgery with permanent exteriorization of cables and leads while being housed solitary in a confined space.

Lamb: Severe

The fetus will undergo chronic instrumentation and induction of hypoxia-ischemia but will not constantly receive sedation and analgesia.

The fetus displays an acute physiological reaction illustrative of discomfort during and after asphyxia. However, due to a continuous "dormant" status of the fetal brain during gestation, the fetus is not aware of discomfort and will not experience it as such (1). However, we still consider this as a serious discomfort since it is acute abrupt and results in changes of brain activity, heart rate, and blood pressure, which are associated discomfort.

## 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.

The fetus will be euthanized at the end of the experiment since examination of organ tissues (especially the brain) is crucial to determine the effects of our treatment(s).

The ewe will be euthanized since the discomfort during the experiment is severe, making re-use not possible. Moreover, undoing the effects of chronic instrumentation will cause an additional increase in discomfort.

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



## Proposal

- [1] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
- [2] Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*. 2008;371(9608):261-9.
- [3] Doyle LW, Faber B, Callanan C, Freezer N, Ford GW, Davis NM. Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence. *Pediatrics*. 2006;118(1):108-13.
- [4] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England journal of medicine*. 2000;342(20):1500-7.
- [5] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1500-7.
- [6] Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al. New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One*. 2012;7(10):e47631.
- [7] Sato A, Ikegami M. SP-B and SP-C containing new synthetic surfactant for treatment of extremely immature lamb lung. *PLoS One*. 2012;7(7):e39392.
- [8] Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91(2):F132-5.
- [9] Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics*. 1996;97(2):210-5.
- [10] Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate*. 2006;89(4):313-22.
- [11] Bancalari E, Claure N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol*. 2003;8(1):63-71.
- [12] Farstad T, Bratlid D, Medbo S, Markestad T. Bronchopulmonary dysplasia - prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. *Acta Paediatr*. 2011;100(1):53-8.
- [13] Kobaly K, Schluchter M, Minich N, Friedman H, Taylor HG, Wilson-Costello D, et al. Outcomes of extremely low birth weight (<1 kg) and extremely low gestational age (<28 weeks) infants

- with bronchopulmonary dysplasia: effects of practice changes in 2000 to 2003. *Pediatrics*. 2008;121(1):73-81.
- [14] Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kerckmar C, et al. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics*. 2003;112(5):e359.
- [15] Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006;367(9520):1421-31.
- [16] Speer CP. Chorionamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. 2009;95(4):353-61.
- [17] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Kramer BW. Thrown off balance: the effect of antenatal inflammation on the developing lung and immune system. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(6):429-37.
- [18] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Gavilanes AW, Kramer BW. [Effects of antenatal inflammation on the developing lung]. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2012;216(4):177-85.
- [19] Soto FJ, Hanania NA. Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(2):129-34.
- [20] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani el H, Steendijk P, Middeldorp M, van der Laarse A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition attenuates persistent heart and lung injury by neonatal hyperoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(1):L56-67.
- [21] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani EH, van Wijngaarden S, Nieuwland K, Wagenaar GT. Phosphodiesterase-4 inhibition attenuates pulmonary inflammation in neonatal lung injury. *Eur Respir J*. 2008;31(3):633-44.
- [22] Mehats C, Franco-Montoya ML, Boucherat O, Lopez E, Schmitz T, Zana E, et al. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on alveolarization and hyperoxia toxicity in newborn rats. *PLoS One*. 2008;3(10):e3445.
- [23] Mehats C, Bourbon J, Jarreau PH. Does PDE4 inhibition improve alveolarisation in hyperoxia-exposed immature rodents? *Eur Respir J*. 2009;33(5):1236; author reply 7.
- [24] Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(204):85-119.

- [25] Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O'Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res.* 2010;11:26.
- [26] Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL. Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(5):588-95.
- [27] Gortner L, Felderhoff-Muser U, Monz D, Bieback K, Kluter H, Jellema R, et al. Regenerative therapies in neonatology: clinical perspectives. *Klin Padiatr.* 2012;224(4):233-40.
- [28] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566-73.
- [29] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-96.
- [30] Jellema RK, Wolfs TG, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, Kuypers E, et al. Mesenchymal stem cells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. *PLoS One.* 2013;8(8):e73031.
- [31] Jellema RK, Lima Passos V, Ophelders DR, Wolfs TG, Zwanenburg A, De Munter S, et al. Systemic G-CSF attenuates cerebral inflammation and hypomyelination but does not reduce seizure burden in preterm sheep exposed to global hypoxia-ischemia. *Exp Neurol.* 2013;250:293-303.
- [32] Jellema RK, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, De Munter S, Vanderlocht J, et al. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep. *J Neuroinflammation.* 2013;10:13.
- [33] Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics.* 1992;90(5):669-73.
- [34] Fox TP, Godavitarne C. What really causes necrotising enterocolitis? *ISRN gastroenterology.* 2012;2012.
- [35] Berger A, Witt A, Haiden N, Kretzer V, Heinze G, Kohlhauser C. Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short-term outcome of preterm infants. *J Perinat Med.* 2003;31(2):115-21.
- [36] Back SA, Riddle A, Dean J, Hohimer AR. The instrumented fetal sheep as a model of cerebral white matter injury in the premature infant. *Neurotherapeutics.* 2012;9(2):359-70.

## Appendix 1

- [1] Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al. New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One*. 2012;7:e47631.
- [2] Nitsos I, Moss TJ, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9:80-5.

## Appendix 2

- [1] Albertine KH. Utility of large-animal models of BPD: chronically ventilated preterm lambs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;308:L983-L1001.
- [2] Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2011:85-119.
- [3] Tralau-Stewart CJ, Williamson RA, Nials AT, Gascoigne M, Dawson J, Hart GJ, et al. GSK256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337:145-54.
- [4] Nials AT, Tralau-Stewart CJ, Gascoigne MH, Ball DI, Ranshaw LE, Knowles RG. In vivo characterization of GSK256066, a high-affinity inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337:137-44.
- [5] Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O'Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res*. 2010;11:26.
- [6] Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL. Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26:588-95.
- [7] Nitsos I, Moss TJ, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9:80-5.
- [8] Shorten PR, O'Connell AR, Demmers KJ, Edwards SJ, Cullen NG, Juengel JL. Effect of age, weight, and sire on embryo and fetal survival in sheep. *J Anim Sci*. 2013;91:4641-53.

# DEC-advies 2015-013

dd. 30-10-2015

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-013
2. Titel van het project: *The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia.*
3. Titel van de NTS: *Het ontwikkelen van nieuwe therapieën/behandelingsmethoden om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen.*
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: DEC-UM
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon:  
[REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - X ontvangen door DEC: 22-10-2015
  - X aanvraag compleet dd. 11-11-2015
  - X in vergadering besproken: 30-10-2015
  - anderszins behandeld
  - X termijnonderbreking(en) van tot 22-10-2015 tot 03-11-2015; 06-11-2015 tot 09-11-2015 tot; 10-11-2015 tot 11-11-2015; 11-11-2015 tot 16-11-2015.
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD

## 7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**

- 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 03-11-2015
- Strekking van de vragen:
  - 1) Titel dekt lading niet; het onderzoek vindt plaats bij schapenfoetussen en niet bij preterm baby's.
  - 2) Wat is de status van de gearceerde stukken tekst. Is de gearceerde tekst aan het eind van 3.1 een recente toevoeging? Het daarin beschreven onderzoek wordt niet in de doelen van 3.2 genoemd!
  - 3) De opbouw van de tekst is verwarrend/slordig. e.g.: In de laatste 7 tekstregels van 3.4.1 staat: "We will focus on the interaction between global hypoxia-ischemia and cell-based therapies". Twee regels verder wordt gesuggereerd dat ook een andere oorzaak van preterm birth pathology (namelijk chorioamnionitis) in het onderzoek betrokken wordt. Aansluitend: "For this purpose, we generated the following three main research questions in this project:" en vervolgens wordt er slechts één genoemd.
  - 4) AIM 1 verwijderen; er is geen AIM 2!
  - 5) Wat betekent EV in MAPC-EV en MSC-EV? Het ligt voor de hand dat het een afkorting is van "extracellular vesicles", maar het wordt nergens vermeld; EV komt alleen in de tabel van de Appendix voor onder A.
  - 6) De powerberekening is niet juist. Als  $\sigma=40$  en  $\delta=30$  dan is  $n=27,9$  (volgens L.Sachs). Als de waarden van  $\sigma$  en  $\delta$  zijn verwisseld, is de uitkomst van  $n$  wel 8,83. Maar dan is nog niet duidelijk op basis van welke read-out (outcome)  $\delta$  en  $\sigma$  zijn gebaseerd. Het zal een van de primaire outcomes zijn. Structural brain injury (postmortem MRI's of immunohistochemische parameters) of brain function(EEG's). Blijkbaar wordt in alle experimenten dezelfde readout parameter gebruikt want de powerberekening geldt voor alle groepen. Maar welke is dan de readout parameter voor de gut-function? Of anders: is de spreiding van die parameter en het beoogd verschil ook gelijk aan 40 en 30 resp?
  - 7) Bij 3.4.3 aim 1c laatste zin, 'a' moet 'are' zijn.
- Datum antwoord 06-11-2015
- Strekking van de antwoorden; **Het PV was niet compleet aangeleverd.**
- **De DEC-UM heeft dd. 09-11-2015 verzocht de stukken compleet aan te leveren.**

- Datum antwoord 10-11-2015
- **De antwoorden hebben geleid tot correcte aanpassing van het projectvoorstel.**  
**De DEC-UM is echter niet tevreden over het aanpassen van de titel en heeft dd. 11-11-2015 nog de volgende vraag/opmerking gesteld:**

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. Echter de titel bevat nog steeds “preterm babies” in de Engelse titel en “vroeggeboortes” in de Nederlandse titel. Men zou hier graag het species hebben vermeld.

De DEC-UM vraagt zich af of het niet beter/correcter is om in de titel al aan te geven welk proefdier gebruikt wordt. Men begrijpt dat de onderzoekers in de titel al de valorisatie (het maatschappelijk belang) van hun onderzoek willen benadrukken, maar omdat het hier toch duidelijk om dierproeven gaat lijkt het zuiver om dat in de titel tot uitdrukking te brengen, bijvoorbeeld door het proefdier te vermelden.

- Datum antwoord 11-11-2015  
**De titel is correct aangepast.**

#### 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 vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet): **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **JA**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: **NVT**

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling: **JA**

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel** belang. **Het belang van de doelstelling wordt door de DEC-UM erkend, te weten: De effectiviteit van therapeutische maatregelen om de uitkomst van premature kinderen te verbeteren.**

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **Naar de overtuiging van de DEC-UM beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.**

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **JA**

- Bedreigde diersoort (en) (10.e.4)
- Niet-menselijke primaten (10.e)
- Dieren in/uit het wild (10.f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10.h)
- Hergebruik (1.e.2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)
- Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode (13.c.3)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **JA**

7. Er zijn **geen** methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**.



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. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren en de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

### **Ethische afweging DEC-UM:**

Het project "*The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia*", wordt door de DEC-UM beoordeeld als een relevante, nieuwe aanpak in de optimalisatie van de behandeling van vroeggeboren kinderen. Dit onderzoek heeft zowel een wetenschappelijk als maatschappelijk belang. Resultaten kunnen te zijner tijd ten goede komen aan vroeg geborenen en hun familie. De gekozen strategie en de concrete doelstellingen lijken passend en haalbaar en kunnen op dit moment niet zonder dierproeven worden behaald. Het project behelst het gebruik van schapen - ooiën en lammeren - die ernstig ongerief zullen ondervinden.

Bij de voorgestelde dierproeven en de verzorging, behandeling en huisvesting van de proefdieren wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven, zoals oog voor het schaap als kuddedier. De betrokken onderzoekers zijn zeer ervaren en goed op de hoogte van de wetenschappelijke ontwikkelingen in het veld. Men bouwt voort op onderzoek dat al eerder is beoordeeld. Er is geen sprake van duplicatie.

**Conclusie:** De DEC-UM acht enerzijds het project "*The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia*" van substantieel belang. Anderzijds onderschrijft zij de intrinsieke waarde van het dier. Gezien het belang en de kwaliteit van het voorgestelde project acht de DEC-UM het gebruik van dieren hier ethisch aanvaardbaar.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

**Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-UM tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar is.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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  
AVD107002015321

**Bijlagen**

2

Datum 24 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002015321. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**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: 1 december 2015  
Geplande einddatum: 1 december 2020  
Titel project: The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia  
Titel niet-technische samenvatting: Het ontwikkelen van nieuwe therapieën behandelingsmethoden om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen.  
Naam DEC: DEC-UM  
Postadres DEC: Postbus 616/[REDACTED] 6200 MD Maastricht  
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:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Plaats: Maastricht

Datum: 18 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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  
AVD107002015321

**Bijlagen**

2

Datum 24 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 24 november 2015

Vervaldatum: 24 december 2015

Factuurnummer: 15700321

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002015321	€ 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

Universiteit Maastricht

Minderbroedersberg 4-6

Postbus 616

6200MD Maastricht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

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

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

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD107002015321

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 17 december 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia' met aanvraagnummer AVD107002015321. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

**Onduidelijkheden**

- In uw aanvraag beschrijft u in de bijlage dierproeven met de hulp van een tabel verschillende experimentele groepen te willen opzetten. Het is voor ons niet duidelijk wat bedoelt u met "1 day, 3 days, 7 days" bij doel 1a. Wat gebeurt na 1, 3 of 7 dagen? Zou u de vermelde termijnen kunnen uitleggen, en ook de criteria waarop de keuze voor deze termijnen is gebaseerd?

- In de tabel bij groep 1d beschrijft u 2 tijdspunten (timing 1 en timing 2). Kunt u nog toelichten hoe u deze 2 tijdspunten definieert?

- Het is bekend dat schapen meer dan 1 lammetje kunnen krijgen. Voor ons is niet duidelijk of u alleen schapen die drachtig zijn van 1 lam includeert. Controleert u hiervoor? Zo nee, worden alle foetussen gebruikt? Zo nee, wat gebeurt het met de niet geopereerde lammetjes? Is hun ongerief meegewogen en hun aantal meegerekend? We zouden graag meer informatie hierover willen ontvangen.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD

vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk **dinsdag, 22 december 2015**, uw antwoord aan ons te sturen.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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.



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Maastricht, 18.12.2015

**Your letter from 17.12.2015**  
**Submission AVD107002015321**

Highly esteemed members of the committee,

Thank you very much for your letter from 17.12.2015 concerning our project 'The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia' with number AVD107002015321.

We are happy to provide you the additional information that you request:

- In uw aanvraag beschrijft u in de bijlage dierproeven met de hulp van een tabel verschillende experimentele groepen te willen opzetten. Het is voor ons niet duidelijk wat bedoelt u met "1 day, 3 days, 7 days" bij doel 1a. Wat gebeurt na 1, 3 of 7 dagen? Zou u de vermelde termijnen kunnen uitleggen, en ook de criteria waarop de keuze voor deze termijnen is gebaseerd?

We want to analyse the time course of the changes that hypoxia-ischemia induce in the fetal brain at 1 day, 3 and 7 days and how the administered therapies affect the changes. We know from other animal models, that hypoxia-ischemia induces within the first day cell death of neurons and induction of pro-inflammatory cytokines. Within 3 days inflammatory cells from the blood are recruited into the brain. At 7 days, structural injury is present. We have published data on the changes at 7 days but have not studied earlier time points (Jellema et al., PLoS One, 2013). Therefore, we request the earlier time points at 1, 3 and 7 days based on the above mentioned rationale.

- In de tabel bij groep 1d beschrijft u 2 tijdstippen (timing 1 en timing 2). Kunt u nog toelichten hoe u deze 2 tijdstippen definieert?

The course of hypoxia-ischemia has several phases of injury: the acute injury as a direct result of oxygen shortage and hypoperfusion, the reperfusion injury (after blood supply and circulation starts again and the cells increase their metabolism again) and the chronic injury. Interventions have been tested in all phases. From clinical work and from our model we know that intervention immediately after the injury is beneficial but does not prevent the reperfusion or chronic injury. Therefore, we want to test the administration of the intervention at different time points to find out how we can optimise the therapeutic effect of our interventions in which phase of the injury process. The first dose of cells or cell-derived products will be given immediately after the hypoxic-ischemic event, the second dose will be tested in timing 1 early in the reperfusion phase (24h after the event) whereas in timing 2 the cells are administered at 72h after the hypoxic event.

- Het is bekend dat schapen meer dan 1 lammetje kunnen krijgen. Voor ons is niet duidelijk of u alleen schapen die drachtig zijn van 1 lam includeert. Controleert u hiervoor? Zo nee, worden alle foetussen gebruikt? Zo nee, wat gebeurt het met de niet geopereerde

lammetjes? Is hun ongerief meegewogen en hun aantal meegerekend? We zouden graag meer informatie hierover willen ontvangen.

We have been working for years with the same breeder and an associated veterinarian. The veterinarian scans the pregnant ewes during early and mid-gestation in order to determine the number of fetuses. Exclusively singleton pregnancies are used for our experiments in this project. Multiple pregnancies are used by us in the approved protocol AVD107002015225.

Please do not hesitate to contact me for any further information!

Yours sincerely,

[Redacted signature block]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Minderbroedersberg 4-6

Postbus 616

6200MD Maastricht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD107002015321

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 19 januari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 20 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia' met aanvraagnummer AVD107002015321. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

**Onduidelijkheden**

1) In uw aanvraag beschrijft u een aantal keuzemomenten. De criteria op basis waarvan u zult besluiten te starten met het project, het onderzoek wel/niet te continueren en te starten met een volgende onderzoeksfase zijn echter niet in voldoende mate beschreven. U wordt verzocht deze criteria in meer detail te beschrijven. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

2) Uw project heeft als doel het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt. Om uw doelstelling te bereiken gaat u onder meer de effectiviteit van door MSCs geproduceerde extracellulaire vesicles in bescherming van de hersenen onderzoeken. Als onderbouwing hiervoor benoemt u het paracrien effect van MSCs op de modulatie van het immuunsysteem. Aangezien een dergelijk paracrien effect door zeer veel verschillende factoren gemedieerd kan worden, wordt u verzocht te beschrijven wat er bekend is over de rol van extracellulaire vesicles in immuunmodulatie. In aanvulling daarop wordt u verzocht nader toe te lichten waarom het volgens u aannemelijk dat MSCs via een paracrien effect bescherming geven aan de hersenen van pasgeborenen.

3) Bij de beoordeling van een aanvraag kijkt de CCD niet alleen naar de doelstelling van een aanvraag, maar ook naar de haalbaarheid van de doelstelling. Om de haalbaarheid van de doelstelling van uw project te kunnen beoordelen, heeft de CCD aanvullende informatie nodig over de te testen cel populaties en vesicles.

MSCs zijn zeer heterogeen. In uw aanvraag beschrijft u niet op welke wijze u MSCs en MAPCs gaat isoleren en of u deze nog moet expanderen om voldoende extracellulaire vesicles te kunnen isoleren. U wordt verzocht dit toe te lichten.

-Extracellulaire vesicles zijn ook zeer heterogeen, zowel qua functionaliteit, grootte en content. U wordt verzocht toe te lichten of bekend is welke subtypes extracellulaire vesicles geproduceerd worden door MSCs en wat het effect is van deze subtypes op verschillende celtypes en/of processen? In aanvulling daarop, wordt u verzocht aan te geven of u een specifieke subset van extracellulaire vesicles gaat isoleren en uw keuze te onderbouwen.

De CCD is van mening dat het belangrijk is om de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles te bepalen voordat in vivo experimenten worden uitgevoerd. Dit om te voorkomen dat onnodig dieren ernstig ongerief moeten ondergaan. U wordt verzocht aan te geven of en op welke wijze u de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles zult bepalen alvorens deze worden gebruikt in dierproeven.

4) Is bekend of transplantatie van humane MSCs in een schaap leidt tot ongewenste bijeffecten die het resultaat van de proef kunnen beïnvloeden?

5) De CCD vraagt zich af of het voor het behalen van de doelstelling van dit project, het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt, noodzakelijk is om te onderzoeken of het beschermende effect van MSCs wordt gemedieerd door de milt? U verzocht nader toe te lichten waarom u dit noodzakelijk acht. U wordt daarnaast verzocht om aan het geven of u andere methoden heeft overwogen die minder ongerief induceren en waarom u deze niet geschikt acht.

6) In uw projectvoorstel meldt u andere 'targets' te willen onderzoeken indien de rol van de milt op het brein in hypoxisch-ischemie niet kan worden bewezen. Welke andere 'targets' verwacht u te onderzoeken en kunt u de hypothese hierachter nader toelichten? Kunt u voor de voorliggende projectaanvraag duidelijker uitwerken wat de keuzemomenten zijn om het onderzoek met andere 'targets' voort te zetten?

#### **Extern advies**

Op basis van artikel 18, lid 3 van de Wet op de Dierproeven kan de CCD inhoudelijk advies vragen aan een onafhankelijke externe partij. De CCD wil gebruik maken van deze mogelijkheid om aan een internationale deskundige enkele vragen te stellen over uw aanvraag. Met het oog op concurrentie binnen uw onderzoeksveld, verzoeken wij u aan te geven welke onderzoekers NIET mogen worden benaderd.

#### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD

vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk **vrijdag, 22 januari 2016**, uw antwoord aan ons te sturen.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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.





## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 19 januari 2016 17:02  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanvullende informatie AVD107002015321

Geachte DEC,

De CCD heeft de volgende vragen aan de aanvrager gesteld:

- 1) In uw aanvraag beschrijft u een aantal keuzemomenten. De criteria op basis waarvan u zult besluiten te starten met het project, het onderzoek wel/niet te continueren en te starten met een volgende onderzoeksfase zijn echter niet in voldoende mate beschreven. U wordt verzocht deze criteria in meer detail te beschrijven. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.
- 2) Uw project heeft als doel het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt. Om uw doelstelling te bereiken gaat u onder meer de effectiviteit van door MSCs geproduceerde extracellulaire vesicles in bescherming van de hersenen onderzoeken. Als onderbouwing hiervoor benoemt u het paracriene effect van MSCs op de modulatie van het immuunsysteem. Aangezien een dergelijk paracrien effect door zeer veel verschillende factoren gemedieerd kan worden, wordt u verzocht te beschrijven wat er bekend is over de rol van extracellulaire vesicles in immuunmodulatie. In aanvulling daarop wordt u verzocht nader toe te lichten waarom het volgens u aannemelijk dat MSCs via een paracrien effect bescherming geven aan de hersenen van pasgeborenen.
- 3) Bij de beoordeling van een aanvraag kijkt de CCD niet alleen naar de doelstelling van een aanvraag, maar ook naar de haalbaarheid van de doelstelling. Om de haalbaarheid van de doelstelling van uw project te kunnen beoordelen, heeft de CCD aanvullende informatie nodig over de te testen cel populaties en vesicles. MSCs zijn zeer heterogeen. In uw aanvraag beschrijft u niet op welke wijze u MSCs en MAPCs gaat isoleren en of u deze nog moet expanderen om voldoende extracellulaire vesicles te kunnen isoleren. U wordt verzocht dit toe te lichten.
 

-Extracellulaire vesicles zijn ook zeer heterogeen, zowel qua functionaliteit, grootte en content. U wordt verzocht toe te lichten of bekend is welke subtypes extracellulaire vesicles geproduceerd worden door MSCs en wat het effect is van deze subtypes op verschillende celtypes en/of processen? In aanvulling daarop, wordt u verzocht aan te geven of u een specifieke subset van extracellulaire vesicles gaat isoleren en uw keuze te onderbouwen. De CCD is van mening dat het belangrijk is om de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles te bepalen voordat in vivo experimenten worden uitgevoerd. Dit om te voorkomen dat onnodig dieren ernstig ongerief moeten ondergaan. U wordt verzocht aan te geven of en op welke wijze u de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles zult bepalen alvorens deze worden gebruikt in dierproeven.
- 4) Is bekend of transplantatie van humane MSCs in een schaap leidt tot ongewenste bijeffecten die het resultaat van de proef kunnen beïnvloeden?
- 5) De CCD vraagt zich af of het voor het behalen van de doelstelling van dit project, het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt, noodzakelijk is om te onderzoeken of het beschermende effect van MSCs wordt gemedieerd door de milt? U wordt verzocht nader toe te lichten waarom u dit noodzakelijk acht. U wordt daarnaast verzocht om aan het geven of u andere methoden heeft overwogen die minder ongerief induceren en waarom u deze niet geschikt acht.
- 6) In uw projectvoorstel meldt u andere 'targets' te willen onderzoeken indien de rol van de milt op het brein in hypoxic-ischemie niet kan worden bewezen. Welke andere 'targets' verwacht u te onderzoeken en kunt u de hypothese hierachter nader toelichten? Kunt u voor de voorliggende projectaanvraag duidelijker uitwerken wat de keuzemomenten zijn om het onderzoek met andere 'targets' voort te zetten?

Bovendien wil de CCD aan een internationale deskundige enkele vragen stellen over deze aanvraag. Op basis van artikel 18, lid 3 van de Wet op de Dierproeven kan de CCD inhoudelijk advies vragen aan een onafhankelijke externe partij.

Met vriendelijke groet,

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

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....  
T: **0900 2800028**

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

Dear members of the CCD,

Please excuse the delay in providing you the requested information. The principal investigator ( [REDACTED] ) is a neonatologist, who takes care of preterm babies and was on clinical service. Please find the information in the enclosure:

#### Onduidelijkheden

1) In uw aanvraag beschrijft u een aantal keuzemomenten. De criteria op basis waarvan u zult besluiten te starten met het project,

We are waiting for the approval by the CCD.

het onderzoek wel/niet te continueren en te starten met een volgende onderzoeksfase zijn echter niet in voldoende mate beschreven. U wordt verzocht deze criteria in meer detail te beschrijven. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

The criteria are as follows:

**Aim a:** The time course identifies what happens when. This is necessary to time the experiments. There is no decision making involved.

**Aim b:** This tests whether the spleen plays a role. The role of the spleen has been studied and suggested in other brain injuries (Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, *et al.*: The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis* 2012, 27:131-41; Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, *et al.*: Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006, 176:6523-31).

If we find that the spleen does not play a role in the preterm brain, we

**will pursue other targets. We refer with targets to possible mechanisms such as interferon gamma signalling: Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, *et al.*: The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis* 2012, 27:131-41 and the work of Seifert HA, Collier LA, Chapman CB, Benkovic SA, Willing AE, Pennypacker KR: Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014, 9:679-89), has identified interferon gamma as a possible "culprit" for the adverse outcome after stroke. We have further developed this concept and studied targets of the interferon gamma pathway and targets that can prevent the activation of this. Interferon gamma production can be taken over by other non-spleen cells. These targets are not part of this animal project.**

**AIM c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM B. The decision making will be based on brain function, inflammation, structure. If cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.**

**AIM d will be a milestone in determining the optimal dosing strategy that will be tested for long term effects in AIM e. The readouts are improved brain function, better structure preservation and less inflammation.**

**- The applicant has a unique track record of doing animal experiments and has served as a DEC member at the University of Maastricht. He completely agrees with the quest of the CCD to reduce the number of animals. There is another aspect beside the ethical dimension: Given the extremely high costs of the animal model, every animal that is not necessary is of measurable benefit to him.**

**2) Uw project heeft als doel het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt. Om uw doelstelling te bereiken gaat u onder meer de effectiviteit van door MSCs geproduceerde extracellulaire vesicles in bescherming van de hersenen onderzoeken. Als onderbouwing hiervoor benoemt u het paracriene effect van MSCs op de modulatie van het immuunsysteem. Aangezien een dergelijk paracrien effect door zeer veel verschillende factoren gemedieerd kan worden, wordt u verzocht te beschrijven wat er bekend is over de rol van extracellulaire vesicles in immuunmodulatie. In aanvulling daarop wordt u verzocht nader toe te lichten waarom het volgens u aannemelijk dat MSCs via een paracrien effect bescherming geven aan de hersenen van pasgeborenen.**

**These are very interesting questions that reflect the current state of scientific discussion. The applicant is a co-author of the position paper on the clinical introduction of extracellular vesicles which is attached as appendix 1. The basis of the hypothesis has been tested in rats which are a model of brain injury for term born babies [Doepfner TR, Herz J, Gorgens A et al. Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression. Stem Cells Transl Med. 2015;4:1131-1143]. Since there is a developmental difference between preterm and term brain structure and function, we cannot use the above mentioned paper as a proof of principle for the quest to develop a therapy for PRETERM babies.**

**3) Bij de beoordeling van een aanvraag kijkt de CCD niet alleen naar de doelstelling van een aanvraag, maar ook naar de haalbaarheid van**

**de doelstelling. Om de haalbaarheid van de doelstelling van uw project te kunnen beoordelen, heeft de CCD aanvullende informatie nodig over de te testen cel populaties en vesicles.**

**MSCs zijn zeer heterogeen. In uw aanvraag beschrijft u niet op welke wijze u MSCs en MAPCs gaat isoleren en of u deze nog moet expanderen om voldoende extracellulaire vesicles te kunnen isoleren. U wordt verzocht dit toe te lichten.**

**The MAPCs are a Federal Drug Administration approved stem cell product. MAPCs are a patented, adult-derived “off-the-shelf” stem cell product platform, for multiple disease indications in the areas of neurological, cardiovascular disease, inflammatory and immune disease, as well as other areas. There are currently six clinical stage programs – including a Phase 2 study in ischemic stroke, a Phase 2 clinical study for the treatment of damage from acute myocardial infarction, a exploratory clinical study in Acute Respiratory Distress Syndrome, and several others.**

**MSCs have been used and studied by us. The source, culture, quality control is described in appendix 2 in which the results are published.**

**-Extracellulaire vesicles zijn ook zeer heterogeen, zowel qua functionaliteit, grootte en content. U wordt verzocht toe te lichten of bekend is welke subtypes extracellulaire vesicles geproduceerd worden door MSCs en wat het effect is van deze subtypes op verschillende celtypes en/of processen? In aanvulling daarop, wordt u verzocht aan te geven of u een specifieke subset van extracellulaire vesicles gaat isoleren en uw keuze te onderbouwen.**

**The extracellular vesicles are produced as follows:**

**Human bone marrow-derived MSCs were raised from bone marrow donors after informed consent according to the Declaration of Helsinki as described previously. Briefly, MSCs were expanded in MSC basal media (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% human thrombocyte lysate, 1% glutamine, and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Their MSC nature was confirmed by flow cytometry with fluorescent labeled anti-CD44, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105 and anti-CD146 antibodies as positive markers as well as with by anti-CD14, anti-CD31 and anti-CD45 antibodies as negative controls. In addition their osteogenic and adipogenic differentiation potential was confirmed in conventional MSC differentiation assays. MSC-EVs were harvested from MSC-conditioned media which were collected from passage 3 onwards, exactly as described before. Briefly, media exchanges were performed every 48 hours. MSC-conditioned media were passed through a 0.22 µm filter membrane (TPP, Trasadingen, Switzerland) and stored at -20°C until usage. Upon processing all conditioned media samples were thawed and processed at once. After adding polyethylene glycol (PEG) and NaCl to a final concentration of 10% PEG 6000 (v/v) and 75 mM NaCl over-night incubation at 4°C, MSC-EVs were concentrated by low speed centrifugation (30 min at 1,500 g). Pellets were washed in 0.9% NaCl twice and resuspended in 0.9% NaCl. MSC-EVs were stored as aliquots of 1 mL, each containing the MSC-EV equivalents harvested from the 48 h conditioned media of  $4 \times 10^7$  cells. Aliquots were stored at -80°C until usage. The obtained MSC-EV fraction was characterized as presented in by Nanoparticle Tracking Analyses (NTA) and Western Blot (Supplementary figure 1) as described previously. Briefly, protein concentrations were determined by the micro BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). 5 µg of the concentrated MSC-EVs were treated with sample buffer (DTT, 0.1% SDS, 0.1 M Tris HCl, pH 7.0) and boiled for 5 min at 95°C. Samples were separated on 12% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Membranes were blocked in 5% skimmed milk in PBS followed by incubation with antibodies recognizing Tsg101 (Sigma-Aldrich) or CD81 (BD). Subsequently, membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Dianova, Hamburg, Germany).**



**Visualization was accomplished by enhanced chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific).**

**Furthermore, it was negatively tested for the presence of bacteria, viruses and endotoxins.**

**This protocol is in line with the position paper in appendix 1, of which the principal investigator is a co-author.**

**De CCD is van mening dat het belangrijk is om de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles te bepalen voordat in vivo experimenten worden uitgevoerd. Dit om te voorkomen dat onnodig dieren ernstig ongerief moeten ondergaan. U wordt verzocht aan te geven of en op welke wijze u de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles zult bepalen alvorens deze worden gebruikt in dierproeven.**

**Please see above, appendix 1 and the technical description above.**

**4) Is bekend of transplantatie van humane MSCs in een schaap leidt tot ongewenste bijeffecten die het resultaat van de proef kunnen beïnvloeden?**

**No adverse events have been described. Please see our publication in appendix 2 for our own experience.**

**5) De CCD vraagt zich af of het voor het behalen van de doelstelling van dit project, het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt, noodzakelijk is om te onderzoeken of het beschermende effect van MSCs wordt gemedieerd door de milt? U verzocht nader toe te lichten waarom u dit noodzakelijk acht. U wordt daarnaast verzocht om aan het geven of u andere methoden heeft overwogen die minder ongerief induceren en waarom u deze niet geschikt acht.**

**The role of the spleen has been studied and suggested in other brain injuries (Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, *et al.*: The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis* 2012, 27:131-41; Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, *et al.*: Splenic atrophy in experimental stroke**

is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006, 176:6523-31).

However, the aim of every medical therapy is to UNDERSTAND why it works. If we determine the role of the spleen we can optimize the therapy. The therapy that we develop will be only available in high income countries. If we understand why it works and we can come up with a cheaper, possibly simpler therapy, we can help preterm babies that do not have the privilege to be born in high income countries.

6) In uw projectvoorstel meldt u andere 'targets' te willen onderzoeken indien de rol van de milt op het brein in hypoxic-ischemie niet kan worden bewezen. Welke andere 'targets' verwacht u te onderzoeken en kunt u de hypothese hierachter nader toelichten? Kunt u voor de voorliggende projectaanvraag duidelijker uitwerken wat de keuzemomenten zijn om het onderzoek met andere 'targets' voort te zetten?

As indicated in the reply to your first question, the role of cytokines is crucial after hypoxia-ischemia. The work of Seifert HA, Collier LA, Chapman CB, Benkovic SA, Willing AE, Pennypacker KR: Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014, 9:679-89, has identified interferon gamma as a possible "culprit" for the adverse outcome after stroke. We have further developed this concept and studied targets of the interferon gamma pathway and targets that can prevent the activation of this. The testing of the targets in animal research IS NOT PART of this animal ethics application.

**Extern advies**

Op basis van artikel 18, lid 3 van de Wet op de Dierproeven kan de CCD inhoudelijk advies vragen aan een onafhankelijke externe partij. De CCD wil gebruik maken van deze mogelijkheid om aan een internationale deskundige enkele vragen te stellen over uw aanvraag. Met het oog op concurrentie binnen uw onderzoeksveld, verzoeken wij u aan te geven welke onderzoekers NIET mogen worden benaderd.

**The principal investigator embraces this idea - if it does not result in further delay. The principal investigator has no objections with respect to the choice of reviewer.**

**This model is not only unique in the Netherlands but in the Western hemisphere. The only other place where this model is available is Auckland, New Zealand. This sheep model has been essential for the development of hypothermia in term babies which has been successfully introduced into clinical care. Recent estimates identified a health benefit of equivalent to 250 million Euro per year by hypothermia. The external reviewer will hopefully convince the CCD that this research is scientifically sound (as already confirmed by the DEC at the University of Maastricht), necessary and instrumental to serve the most vulnerable patients that have no lobby to work for them. In addition, this work is carried out by people who have a track record of innovative translational research.**

**Sincerely,**

**[Redacted signature]**

**[Redacted signature]**



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

### Universiteit Maastricht

Minderbroedersberg 4-6

Postbus 616

6200MD Maastricht



### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

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

0900-28 000 28 (10 ct /min)

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

### Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015321

Datum **03 FEB. 2016**  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

### Bijlagen

1

Geachte [REDACTED]

Op 20 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia" met aanvraagnummer AVD107002015321. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 december 2015 en op 24 januari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD met betrekking tot de in de aanvraag vermelde behandeltermijnen en de vooraf controle op eenlingszwangerschap beantwoord. U heeft de keuzemomenten uitgewerkt, meer informatie over de selectieprocedure van de te gebruiken therapieën gegeven, en de rol van de milt in de door u gestelde hypothese meer toegelicht.

### 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: een opschortende voorwaarde, en een algemene voorwaarde die de CCD stelt aan meerjarige projecten om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10a. lid 1 van de wet.

U beschrijft in uw aanvraag dat wanneer effectiviteit van cell-based therapie niet bewezen kan worden verdere experimenten, deel D en deel E, niet worden uitgevoerd. Gezien de complexiteit van deze aanvraag en het cumulatief ernstige ongerief dat de dieren ondervinden verbindt de CCD een opschortende voorwaarde aan de vergunning. Deze voorwaarde bestaat hieruit, dat de CCD na de uitvoer van deel A t/m deel C een voortgangsrapportage van u ontvangt. Deze rapportage bestaat uit een welzijnsevaluatie en resultaten op basis waarvan u besluit het project voort te zetten of te stoppen. Wanneer u mogelijkheden ziet om de proefopzet te verfijnen of het ongerief voor de dieren te verminderen hoort de commissie dit ook graag van u. U kunt alleen dan uw project voortzetten wanneer de CCD kennis heeft genomen van uw rapportage en ingestemd heeft met voortzetting van uw project.

Deze instemming kan worden verkregen met behulp van een besluit op een ingediende wijzigingsaanvraag.

U kunt met uw project "The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia" starten, met de delen A t/m C. De vergunning wordt afgegeven van 3 februari 2016 tot en met 1 december

2020, onder de opschortende voorwaarde zoals hierboven beschreven. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de datum in de aanvraag in het verleden ligt. 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 DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.


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

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

#### **Meer informatie**

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

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: Universiteit Maastricht  
Adres: Postbus 616  
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT  
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 februari 2016 tot en met 1 december 2020, voor het project "The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia" met aanvraagnummer AVD107002015321, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 november 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 november 2015;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 oktober 2015, ontvangen op 24 november 2015;
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 december 2015 en op 24 januari 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Global hypozia-ischemia	Schapen (Ovis aries) / Texel schapen; drachtige oaien en foetussen	840	Ernstig / severe	420 drachtige oaien en 420 foetussen.

### Voorwaarden

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

1) De CCD ontvangt van u een voortgangsrapportage na de uitvoer van deel A t/m deel C. Deze rapportage bestaat uit een welzijnsevaluatie en resultaten op basis waarvan u besluit het project voort te zetten of te stoppen. Het project mag pas worden voortgezet na instemming van de CCD.

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 Instantie voor Dierenwelzijn 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 de dieren ernstig ongerief ondervinden is er een beoordeling achteraf bij deze aanvraag vereist. Deze moet binnen één jaar na de afloop van de vergunning plaatsvinden.



# 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.

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

#### **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.

Deze beoordeling zal uiterlijk december 2021 plaatsvinden. 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 proeven dieren conform de vergunning waren.