

Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016447								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 en 2			x				x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail nieuwe NTS 4-4-2016				x		x	x	
8	Niet-technische samenvatting herzien	x							
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling DEC 19-4-2016				x		x	x	

26 FEB. 2016



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 1447 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted] KvK-nummer 4 1 0 5 5 6 2 9
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer Geert Grooteplein 10 Postbus 9101, t.a.v. [Redacted] Postcode en plaats 6500HB Nijmegen IBAN NL90ABNA0231209983 Tenaamstelling van het rekeningnummer UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [Redacted] Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [Redacted] Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 4 _ 0 3 _ 2 0 1 6
- Einddatum 2 4 _ 0 3 _ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Een verlamd afweersysteem in ernstig zieke patiënten; bijdragende factoren en behande
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.187,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

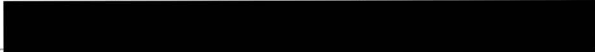
6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 24 - 02 - 2016

Handtekening 

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis |

2 Categories

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

Forensic enquiries

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The burden of septic shock at the Intensive Care and the role of immunoparalysis

With an incidence of over 20 million patients a year worldwide, sepsis is a major health care burden (1). Septic shock is defined by a fluid refractory shock state with a mortality up to 30%, and its incidence is increasing (2-4). The release of pro-inflammatory mediators in sepsis results in the loss of peripheral vascular resistance, resulting in hemodynamic instability and end-organ failure (5, 6). Often vasopressor therapy is necessary to improve hemodynamic parameters, of which, noradrenaline is the primary agent of choice since the birth of modern day critical care in the 1950's (7). Previous strategies have aimed to treat sepsis by targeting pro-inflammatory mediators. However, most of these approaches have failed (6, 8-10). This is probably due to the fact that the majority of sepsis patients do not succumb to the initial pro-inflammatory "hit", but die at a later time-point in a pronounced immunosuppressive state that renders them unable to clear their primary infection and extremely vulnerable towards secondary infections (5, 6, 11-23). Traditionally, the immune response in sepsis was envisioned as a biphasic sequelae of events, namely a hyperinflammatory reaction followed by a compensatory anti-inflammatory reaction. However, there is increasing evidence that immunoparalytic mechanisms exist from the onset of sepsis (14, 19, 24, 25). As such, immunoparalysis is increasingly being recognized as the overriding immune dysfunction during sepsis (22, 23).

Many mechanisms are implicated in sepsis-induced immunoparalysis, including impaired pro-inflammatory (e.g. TNF- α and IL-6) and enhanced anti-inflammatory (e.g. IL-10) cytokine production, reduced antigen presenting capacity and phagocytic functions, depletion of several immune cells by apoptosis, inhibition of T cell function by negative signalling pathways, and increased numbers of suppressive immune cell subpopulations such as regulatory T cells (5, 6, 8, 10-18, 26-34). Moreover, several signs of immunoparalysis, namely downregulation of mHLA-DR on monocytes, attenuated *ex vivo* TNF- α production by stimulated monocytes, and increased expression of Programmed-Death-1 on T cells, have been associated with increased mortality in sepsis (21, 35). Novel therapeutic targets and strategies, including PD-L1, CTLA-4, IFN- γ , GM-CSF and IL-7 (36-40) are currently under investigation. However, we hypothesize that our current management patients with septic shock, specifically the use of noradrenaline, importantly contributes to sepsis-induced immunoparalysis.

Noradrenaline and immunoparalysis

As mentioned earlier, the catecholamine noradrenaline is the cornerstone treatment for septic shock in the ICU, virtually all patients with septic shock are treated with this compound (41). Noradrenaline signals via alpha (α 1-2) and beta (β 1-3) adrenergic receptors (adrenoceptors). Interestingly, catecholamines exert profound immunosuppressive effects, but these have mainly been investigated for adrenaline. Adrenaline was shown to potently inhibit LPS-induced production of TNF- α , and enhance production of anti-inflammatory IL-10 *in vitro* as well as in animal and human models of inflammation (42-44). These effects were shown to be dependent on the β -adrenergic receptor, as they were abolished by use of β -blockers (45). Furthermore, we have recently shown that endogenously increased production of adrenaline in humans potently dampens the inflammatory response, again through increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (46). The effects of noradrenaline, a potent α -adrenergic agonist which also has β affinity, on the immune system are far less studied, and *in vivo* data are lacking altogether. Nevertheless, *in vitro*, noradrenaline, inhibits pro-inflammatory cytokine production as potently as adrenaline, and effects were shown to be abolished by β -blockers (44, 47, 48) Therefore, treatment with noradrenaline may importantly contribute to sepsis-induced immunoparalysis.

Alternative vasopressors

There are viable vasopressor alternatives for hemodynamic support in septic shock patients, namely vasopressin (49) and phenylephrine (50, 51), which are both non-catecholaminergic agents. Vasopressin acts on V1 and V2 receptors, while phenylephrine is a selective α -adrenergic receptor agonist. No immunosuppressive effects have been associated with these receptors. Therefore, these vasopressors could pose a non- (or less) immunosuppressive alternative to noradrenaline, and thus prevent or alleviate sepsis-induced immunoparalysis. However, data on immunologic effects of these vasopressors is not available.

Synthesis

Taken together, immunoparalysis plays an important role in morbidity and mortality in critically ill patients. As outlined above, noradrenaline may importantly contribute to immunoparalysis and alternative vasopressors may be superior in this respect. However, *in vivo* data are lacking. This project will provide these data. Identifying the differences in putative immunomodulatory effects of noradrenaline and alternative vasopressors, and their relative contribution to sepsis-induced immunoparalysis will ultimately contribute to optimization of hemodynamic management in septic patients.

References

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29(7):1303-10.
2. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(12):862-74.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine*. 2003;348(16):1546-54.
4. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*. 2011;140(5):1223-31.
5. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 2013;369(9):840-51.
6. Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *Jama*. 2011;306(23):2614-5.
7. Weil MH, Tang W. From intensive care to critical care medicine: a historical perspective. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(11):1451-3.
8. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. Sepsis: time to reconsider the concept. *Critical care medicine*. 2008;36(3):964-6.

9. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama*. 2013;309(11):1154-62.
10. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 1987;317(11):653-8.
11. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive care medicine*. 2006;32(8):1175-83.
12. Heidecke CD, Weighardt H, Hensler T, Bartels H, Holzmann B. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen*. 2000;71(2):159-65.
13. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(2):316-21.
14. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Molecular medicine*. 2008;14(1-2):64-78.
15. Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P. Sepsis: time has come to focus on the later stages. *Medical hypotheses*. 2008;71(2):203-8.
16. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Foundation symposium*. 2007;280:21-7; discussion 7-36, 160-4.
17. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(2):325-37.
18. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama*. 2011;306(23):2594-605.
19. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiological reviews*. 2013;93(3):1247-88.
20. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *Jama*. 2008;300(4):413-22.
21. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive care medicine*. 2010;36(11):1859-66.
22. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(12):1287-93.
23. Hamers L, Kox M, Pickkers P. Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva anesthesiologica*. 2015;81(4):426-39.
24. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *Journal of immunology*. 2006;177(3):1967-74.
25. Tamayo E, Fernandez A, Almansa R, Carrasco E, Heredia M, Lajo C, et al. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *European cytokine network*. 2011;22(2):82-7.
26. Nolan A, Kobayashi H, Naveed B, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, et al. Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PloS one*. 2009;4(8):e6600.
27. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:677-704.

28. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Critical care*. 2012;16(3):R112.
29. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129(4):474-81.
30. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(3):162-74.
31. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):327-36.
32. Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E. The role of T regulatory cells in human sepsis. *Journal of autoimmunity*. 2009;32(3-4):211-5.
33. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *Journal of immunology*. 2001;166(11):6952-63.
34. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, McDonough JS, Perlman H, McDunn JE, et al. Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages. *Shock*. 2009;31(4):359-66.
35. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical care*. 2011;15(2):R99.
36. Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, et al. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Critical care*. 2014;18(1):R3.
37. Inoue S, Bo L, Bian J, Unsinger J, Chang K, Hotchkiss RS. Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock*. 2011;36(1):38-44.
38. Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LA, van der Hoeven JG, et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(9):838-45.
39. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(7):640-8.
40. Shindo Y, Unsinger J, Burnham CA, Green JM, Hotchkiss RS. Interleukin-7 and anti-programmed cell death 1 antibody have differing effects to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Shock*. 2015;43(4):334-43.
41. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical care medicine*. 2008;36(1):296-327.
42. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(3):713-9.
43. Van der Poll T, Lowry SF. Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 beta production: roles of tumor necrosis factor-alpha and IL-10. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 2):R1885-90.
44. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, et al. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock*. 1999;12(6):421-7.
45. Monastra G, Secchi EF. Beta-adrenergic receptors mediate in vivo the adrenaline inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor release. *Immunology letters*. 1993;38(2):127-30.
46. Kox M, van Eijk LT, Zwaag J, van den Wildenberg J, Sweep FC, van der Hoeven JG, et al. Voluntary activation of the sympathetic nervous system and attenuation of the innate immune response in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(20):7379-84.

47. van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP, van Deventer SJ. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun.* 1994;62(5):2046-50.
48. Rontgen P, Sablotzki A, Simm A, Silber RE, Czeslick E. Effect of catecholamines on intracellular cytokine synthesis in human monocytes. *Eur Cytokine Netw.* 2004;15(1):14-23.
49. Hall LG, Oyen LJ, Taner CB, Cullinane DC, Baird TK, Cha SS, et al. Fixed-dose vasopressin compared with titrated dopamine and norepinephrine as initial vasopressor therapy for septic shock. *Pharmacotherapy.* 2004;24(8):1002-12.
50. Ji MH, Yang JJ, Wu J, Li RQ, Li GM, Fan YX, et al. Experimental sepsis in pigs--effects of vasopressin on renal, hepatic, and intestinal dysfunction. *Upsala journal of medical sciences.* 2012;117(3):257-63.
51. Laviolle B, Donal E, Le Maguet P, Laine F, Bellissant E. Low doses of fludrocortisone and hydrocortisone, alone or in combination, on vascular responsiveness to phenylephrine in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology.* 2013;75(2):423-30.

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 overall objective of this project is to identify whether noradrenaline contributes to sepsis-induced immunoparalysis in animal models that are relevant to the critically ill patient, and if the alternative vasopressors phenylephrine and/or vasopressin are superior in this respect .

First, we aim to investigate the effects of noradrenaline, vasopressin, and phenylephrine on the immune response *in vivo*. This subobjective (a below) will be studied using the LPS model, a standardized model to investigate the immune response which we have extensive experience with. After these experiments, we aim to investigate the contribution of noradrenaline to the development of immunoparalysis in primary and secondary infections (subobjective b below). Primary infection will consist of cecal ligation and puncture (CLP, the gold standard model of sepsis) (1). Secondary infection consists of *Pseudomonas Aeruginosa* infection (one of the most prevalent causative organism of secondary pneumonia in sepsis patients) (1, 2). Finally, we want to evaluate whether vasopressin and/or phenylephrine do not, or to a lesser extent, contribute to immunoparalysis in primary and secondary infections.

The subobjectives of this project are:

- a.** To investigate the putative immunosuppressive effects of noradrenaline, and compare these to vasopressin and phenylephrine.
- b.** To investigate whether noradrenaline contributes to the development of sepsis-induced immunoparalysis in primary and secondary infections.
- c.** To explore vasopressin and/or phenylephrine as alternative vasopressors to prevent or limit sepsis-induced immunoparalysis in primary and secondary infections.

We think that these objectives are certainly attainable within 5 years.

Structure and cooperation

This project is embedded in a long-standing translational research program on the modulation of the host response in infectious diseases. Our research group has more than 10 years of experience with immunological animal studies, and we are uniquely situated to translate our results

obtained in animal experiments to humans *in vivo*, both in healthy volunteers (for instance in the experimental human endotoxemia model, which is only operational in a few centres worldwide) and in critically ill patients. Also in this project, our goal is to translate the findings obtained in animals first to healthy volunteers and ultimately to patients with septic shock. Our research is published in international peer-reviewed journals, and ample external funding has been obtained to conduct this research ([REDACTED], [REDACTED]).

.Our laboratory is well equipped, including a close cooperation with the [REDACTED], [REDACTED] which the project leader headed for several years before moving to his present position.

We have a long and fruitful collaboration with the [REDACTED]. They have a world-renowned track record regarding inflammation research. Further local collaborations include the [REDACTED].

(Inter)nationally, we work together with several research groups on the topics of sepsis-induced immunoparalysis: [REDACTED]

[REDACTED] We believe the aims of this project are feasible within 5 years, as we have already performed similar studies and make use of well-described models that are operational at our institute (LPS model, placement of micro-osmotic pumps) or at the laboratories of our collaborators (CLP model and Pseudomonas model).

References

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. Shock. 2014;41(2):109-14.
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. Chest. 2011;139(4):909-19.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

The results of this project will further progress our insights into the causes and mechanisms of sepsis-induced immunoparalysis in critically ill patients. More specifically, we will investigate whether noradrenaline, by far the most used vasopressor in septic shock, importantly contributes to sepsis-induced immunoparalysis, and provide the first evidence for superior effects of alternative treatments for these patients. In a broader sense, this project will provide increased knowledge of basic immunological mechanisms, most significantly the adrenergic system, which are applicable to other immune system-related diseases than solely those encountered in critically ill patients.

Social relevance

There are currently no specific markers available that can be used in routine clinical practice to identify patients with immunoparalysis. Therefore, epidemiologic data on the number of patients suffering from immunoparalysis is lacking. However, the fatalities that can be attributed immunoparalysis for sepsis patients alone can be estimated. The mortality of sepsis is approximately 30%(1). Of these fatal cases, 75% dies after 4 days, thus in a later stage of the disease which was shown to be closely related to immunoparalysis(2). As the worldwide incidence of sepsis is

estimated conservatively at 20 million per year(3), this accounts to approximately 4 million patients per year. Furthermore, in the USA alone, sepsis-associated healthcare costs add up to 25 billion US dollars(4). This indicates that identification of contributing factors and underlying mechanisms of sepsis-induced immunoparalysis, and assessment of our current approach to sepsis is highly relevant and warranted.

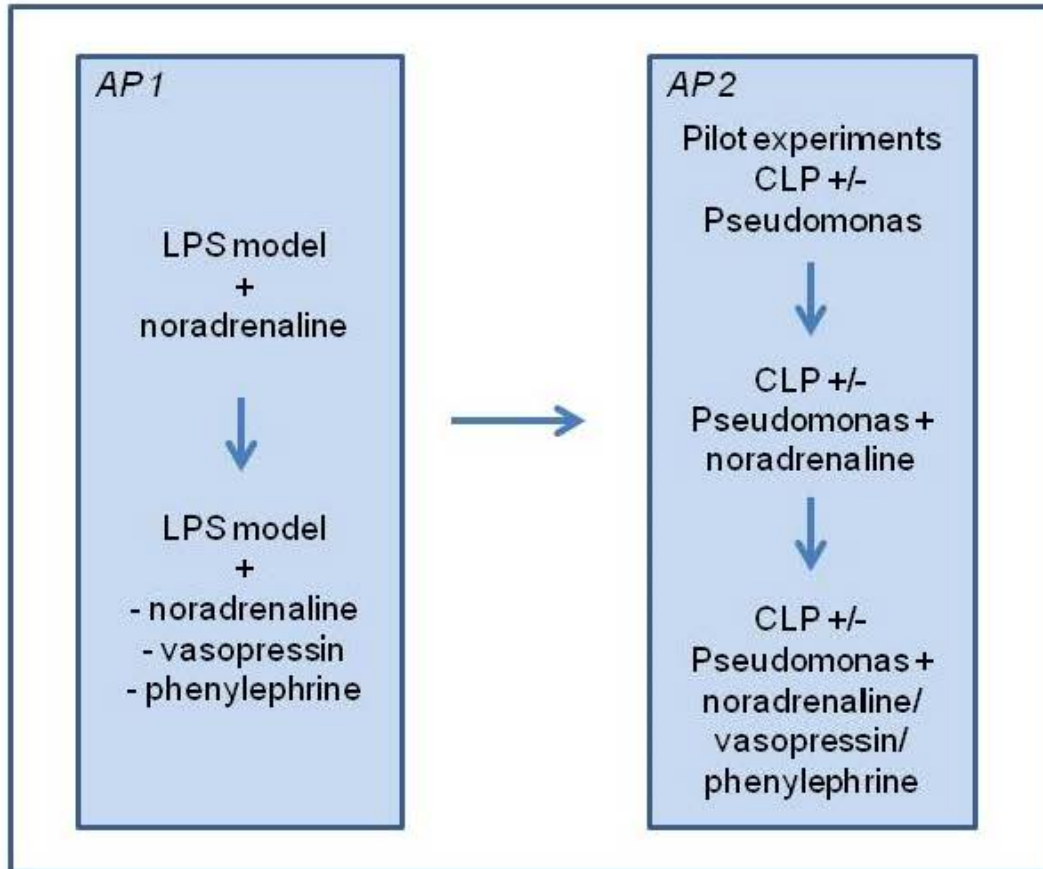
References

1. Jawad I, Luksic I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *Journal of global health*. 2012;2(1):010404.
2. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Current opinion in immunology*. 2013;25(4):477-83.
3. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.
4. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40(3):754-61.

3.4 Research Strategy

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

The research strategy to obtain our objectives is depicted in the flowchart below, and will be further detailed in the research strategy outline (3.4.2). Coherence and global go/no-go points are described in the coherence section (3.4.3). As depicted in the flowchart, the project comprises 2 animal procedures (APs). We will start with AP 1. Information from AP1 will be used for AP2 (see 3.4.2 and 3.4.3). In AP2, we will initially perform pilot experiments with the CLP and *Pseudomonas* models as these are not yet operational in our institute. This experience can then be used for the next phases of this AP. Of note, we already have extensive experience with the LPS model, and a department at our institute we closely collaborate with (Pharmacology and Toxicology) has ample experience with micro-osmotic pumps (for continuous administration of vasopressors). The CLP and *pseudomonas* models are operational at collaborating departments.



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.

Animal procedure 1: Identifying the immunosuppressive effects of noradrenaline and evaluating alternative vasopressors

Mice will be treated with noradrenaline, vasopressin, or phenylephrine, and challenged with LPS to assess immunosuppressive effects of these vasopressor agents. Vasopressors will be delivered continuously by a micro-osmotic pump, to make it as relevant as possible to the clinical situation. Different timings of vasopressor agents relative to LPS administration will be evaluated. We have extensive experience with the LPS model and a department we closely collaborate with within our institute ([REDACTED]) has ample experience with micro-osmotic pumps.

Animal procedure 2: Identifying the involvement of noradrenaline in immunoparalysis and evaluating alternative vasopressors to prevent immunoparalysis

The contribution of noradrenaline to the development of immunoparalysis and the putative superior effects of vasopressin and/or phenylephrine will be evaluated in the CLP model, in some cases followed by *Pseudomonas Aeruginosa* infection (further described below). Mice will undergo cecal ligation and puncture (CLP, the gold standard model of sepsis)(1), in some cases followed by *Pseudomonas Aeruginosa* infection (one of the most prevalent causative organism of secondary pneumonia in sepsis patients)(1, 2). Using this approach, we can both assess effects on clearance of the primary polymicrobial infection as well as vulnerability towards secondary infections. As the CLP and CLP+*Pseudomonas* models are currently not operational in our institute, we will set up these models. For CLP, we will use a model in which mice are sacrificed at day 4 based on work from a collaborating group in [REDACTED]. We do not expect difficulties, as this model is used by numerous research groups around the world, also by two we collaborate with ([REDACTED]). For the CLP+*Pseudomonas* model, we will infect mice with *P. Aeruginosa* 4 days after CLP and sacrifice mice 24 hours after infection, also based on work from a collaborating group in [REDACTED].

References

1. [REDACTED]
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.
3. Chang KC, Burnham CA, Compton SM, Rasche DP, Mazuski R, Smedonough J, et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care*. 2013;17(3):R85.
4. [REDACTED]

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

For a schematic overview of the coherence between the different animal procedures and sequence of events within animal procedures, see the flowchart in the research strategy (3.4.1).

Our planned experiments are clearly aimed at assessing the contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis and evaluating the effects of viable alternative vasopressors. The two APs will be conducted subsequently as AP1 will show which alternative vasopressor exerts the least immunosuppressive effects. If both alternative vasopressors show equally less immunosuppressive effects, both will be used in AP2. The arrows in the flowchart indicate the global go/no-go points (either between or within APs), which are further detailed below. A more detailed flowchart with the go/no-go points within APs is provided in the AP appendices.

Global go/no-go points

If we do not find that noradrenaline exerts immunosuppressive effects, the experiments with vasopressin and phenylephrine will not be performed. If we demonstrate that vasopressin and/or phenylephrine have less or no immunosuppressive effects compared with noradrenaline in the LPS model (AP1), there is no need to move on to AP2. If, for whatever reason, we are not able to set up the CLP and the CLP+Pseudomonas models in AP2, we will not move on to the experiments in which the contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis is evaluated. Finally, if we find that noradrenaline plays no or only a very minor role in immunoparalysis using the CLP or CLP+Pseudomonas models, we will not move on to testing alternative vasopressors in those respective models.

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	LPS model for immunosuppression
2	CLP model for immunoparalysis

Format**Niet-technische samenvatting**

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven.
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	<u>De bijdrage van noradrenaline aan verlamming van het afweersysteem bij bloedvergiftiging.</u>
1.2	Looptijd van het project	<u>24-3-2016 - 24-3-2021</u>
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	<u>bloedvergiftiging, ontsteking, infectie, afweersysteem</u>

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Patiënten met ernstige infecties (bloedvergiftiging genoemd) op de Intensive Care knappen vaak slecht op of krijgen zelfs nieuwe infecties bovenop de al bestaande infectie. Dit leidt tot hoge sterfte onder deze patiënten. Dit komt omdat bij deze patiënten het afweersysteem niet goed meer werkt, en daardoor de bestaande of nieuwe infecties niet goed kan bestrijden. Vrijwel alle patiënten met bloedvergiftiging krijgen een medicijn toegediend om hun bloeddruk op peil te houden. Dit middel heet noradrenaline. Er zijn aanwijzingen dat noradrenaline zorgt voor een verminderde werking van het afweersysteem. Zo zou het meest gebruikte medicijn voor de behandeling van bloedvergiftiging dus kunnen bijdragen aan het slechte herstel van diezelfde bloedvergiftiging en het krijgen van nieuwe infecties. Dit is echter nog niet onderzocht. Verder zijn er alternatieve medicijnen beschikbaar die de bloeddruk op peil kunnen houden maar waarschijnlijk geen of minder effecten hebben op het afweersysteem. Dit is echter ook nog onvoldoende duidelijk. In dit project willen we onderzoeken of noradrenaline inderdaad bijdraagt aan een slechter werkend afweersysteem bij patiënten met bloedvergiftiging en of er alternatieve medicijnen zijn die deze effecten niet hebben.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Door dit onderzoek krijgen we meer inzicht in de oorzaken van een onderdrukt afweersysteem bij ernstig zieke patiënten met bloedvergiftiging op de Intensive Care, en kunnen we alternatieve behandelingen onderzoeken om dit afweersysteem weer beter te laten functioneren. Hierdoor zullen in de toekomst patiënten beter in staat zijn infecties te bestrijden en nieuwe infecties te voorkomen. Uiteindelijk zal dit ervoor zorgen dat er minder mensen dood gaan aan infecties.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Muizen, 2256.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Het ongerief zal voornamelijk bestaan uit de ontsteking en afweerreactie die wordt veroorzaakt door het toedienen van een stof of ziekteverwekker. Verder zullen sommige dieren een operatie moeten ondergaan voor het aanbrengen van een infuus. Dit zal echter onder algehele verdoving gebeuren om het ongerief te beperken.

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Over het gehele project zullen de muizen verschillend scoren op ongerief: Terminaal: 0% Mild: 0% Matig: 65% Ernstig: 35% 35% van de muizen zal ernstig ongerief ondervinden, omdat er gebruik gemaakt wordt van een diermodellen van ernstige infecties. Dit is onvermijdelijk omdat we willen onderzoeken of noradrenaline bijdraagt aan een minder goed werkend afweersysteem bij bloedvergiftiging. Bloedvergiftiging is per definitie een ernstige infectie, waardoor de diermodellen hiervoor ook tot ernstig ongerief leiden.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren zullen aan het eind van het experiment worden gedood.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De ontwikkeling van een afweerreactie is een complex proces, waarin verschillende cellen en organen op elkaar reageren. Het kan zijn dat een effect op bepaalde cellen van het afweersysteem zich vertaalt naar veranderingen in andere cellen, waardoor het uiteindelijke effect van de afweerreactie verandert. Deze interacties zijn dus niet in het laboratorium of in computermodellen te onderzoeken, maar alleen in levende wezens, en de muis is de laagste diersoort waarvan het afweersysteem vergelijkbaar is met die van mensen.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	We zullen per experiment een berekening maken waarbij het benodigd aantal muizen zo laag mogelijk wordt gehouden als wetenschappelijk verantwoord is, maar voldoende om iets zinnigs over het effect te kunnen concluderen. Bovendien zullen we in kleinere groepen muizen en met modellen die minder ongerief veroorzaken bekijken of er "muziek zit" in bepaalde mechanismen/behandelingen alvorens gebruik te maken van grotere groepen muizen of modellen met meer ongerief.

- 4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- Alle handelingen worden door ervaren onderzoekers en dierverzorgers uitgevoerd, waardoor het ongerief zo laag mogelijk wordt gehouden. Wanneer mogelijk zullen we verdoving gebruiken. De conditie van de muizen wordt vaak gecontroleerd volgens een gestandaardiseerde scoringsmethode en humane eindpunten zullen gerespecteerd worden. Mocht een dier teveel lijden, dan wordt het dier uit de proef gehaald. De dieren worden samen gehuisvest waar mogelijk en er zal kooiverrijking aanwezig zijn.
- 4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- Buiten de punten die genoemd worden onder het kopje "verfijning" zal de volgende extra voorzorgsmaatregel worden genomen:
Het toewijzen van dieren aan behandelingsgroepen zal zo vroeg mogelijk in de experimenten uitgevoerd worden. Het wijzigen van deze toewijzingen zal zo weinig mogelijk gebeuren. Zo wordt onnodig storen van de dieren evenals verstoring van de sociale structuren zo veel mogelijk voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure LPS model for immunosuppression

2 Description of animal procedures

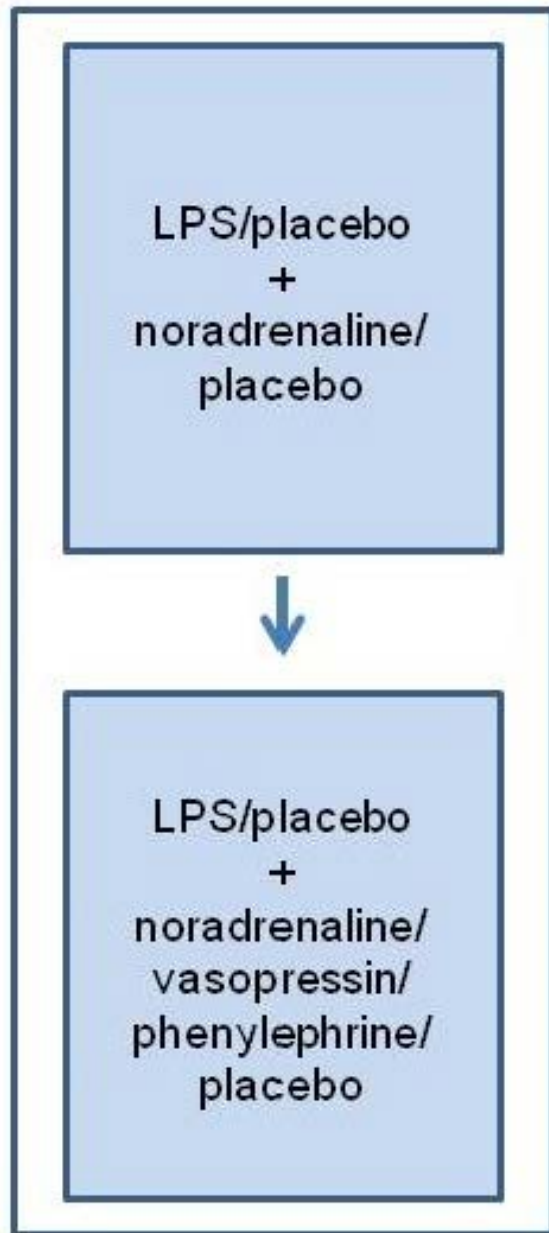
A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This animal procedure is aimed at investigating the effects of noradrenaline, vasopressin, and phenylephrine on the immune response *in vivo*. This will be evaluated using the LPS model, a standardized model to investigate the immune response. Vasopressors will be delivered continuously by a micro-osmotic pump, to make it as relevant as possible to the clinical situation. The vasopressors used are noradrenaline, vasopressin, and phenylephrine. Three different timings of vasopressor administration relative to LPS/placebo administration will be employed (all within 24 hours of LPS administration) to evaluate effects of long-term and short-term exposure to vasopressors. Furthermore, we will sacrifice mice at three different time-points (1.5-8 hours after LPS administration) to evaluate different cytokine profiles (some cytokines peak early, others later on). A detailed description of the procedures is provided in section A2.

We have extensive experience with the LPS model and a department we closely collaborate with within our institute [REDACTED] has ample experience with micro-osmotic pumps.

The flowchart of this animal procedure including the go/no-go point (indicated by an arrow) is provided below. We will start experiments to investigate the putative immunosuppressive effects of noradrenaline. If we indeed demonstrate immunosuppressive effects of noradrenaline, we will move on to the comparative experiments with all three vasopressors.



Primary outcome parameter:

The primary endpoint will be pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma and various tissues, to measure local and systemic inflammatory effects.

Secondary outcome parameters:

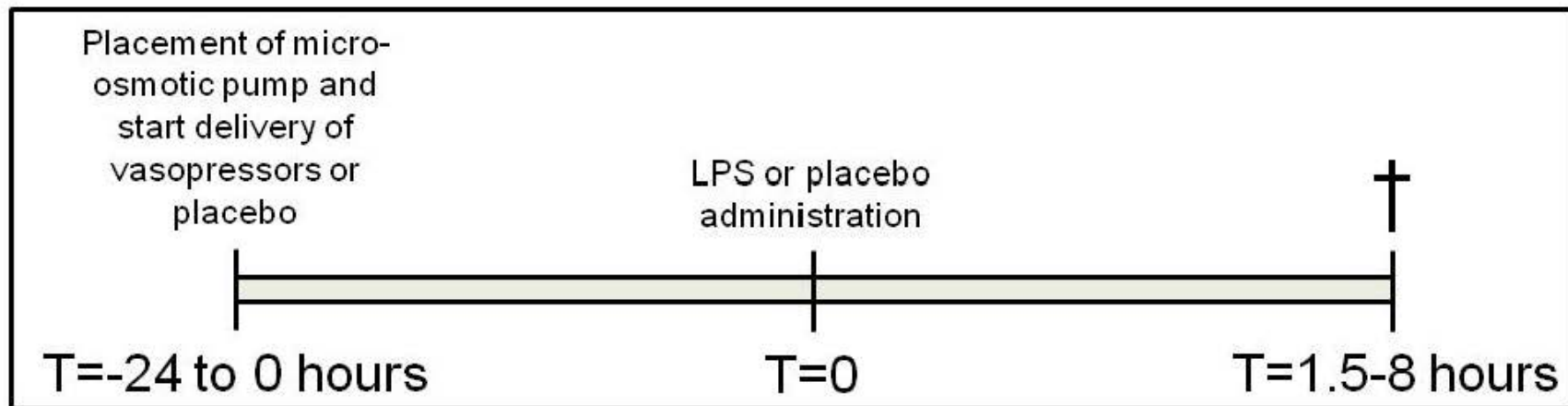
- Flow cytometric analysis of different cell populations obtained from blood/tissues to assess cell surface markers and functionality (the latter after *ex vivo* restimulation).
- Gene expression profiles in various tissues.
- Histology of various tissues.
- Markers of organ damage (MPO, creatinin, urea, AST, ALT etc.), measured in blood/tissues.
- Wet & dry ratios to measure capillary permeability disorders in lung.
- Blood gas analysis to assess pulmonary function.
- X-thorax to evaluate pulmonary abnormalities.
- Clinical parameters: Weight, body temperature, ruffled coat, hunched back, reduced mobility, and moribund state.

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

A schematic overview of the procedures is provided in the figure at the bottom of this section.

Maximally 24 hours before LPS administration, mice will be anesthetized with isoflurane, a small incision will be made on the back of the mice, and the micro-osmotic pump will be placed subcutaneously and connected to the jugular vein for the continue infusion of vasopressors or placebo.

At T=0, mice will be injected with LPS (5 mg/kg) or placebo (saline). 1.5-8 hours post-administration, mice will be deeply anesthetized with isoflurane for exsanguination through orbital extraction followed by cervical dislocation, after which blood and organs will be harvested.



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

The number of mice required to obtain statistical significance will be calculated using power calculations based on data from literature and previous experiments. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations. Naturally, during the course of this project, we will make use of the data obtained to further optimize the power calculations to prevent the use of too many or too little mice to reach our objectives. Power will be set at 80%, and alpha at 0.05. When required, Bonferroni correction will be used to correct for multiple testing.

The type of statistical tests used for analysis of the data obtained from this procedure is dependent on the nature of the data. For instance, cytokine levels between groups will be compared with unpaired t-tests or Mann-whitney U tests (2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively), or one-way analysis of variance or Kruskal-Wallis with the appropriate post-hoc tests (more than 2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively).

B. The animals

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

Species Similar all our other experiments within this project, we will primarily make use of wild-type male C57BL/6J mice, aged 6-8 weeks. We use the male sex, because male mice do not have a variation in the hormonal cycle like female mice which affects the inflammatory response. It is well-known that in patients, gender influences the immune response during sepsis (recently reviewed in (1)). Women display better outcome of sepsis compared with men, and this is ascribed to sex hormones (1). Furthermore, in the LPS (2, 3) and CLP (4) models in mice, immunologic effects of sex hormones and differences between the sexes have been demonstrated. Therefore, the interindividual variation is expected to be lower when we only use male mice, which in turn results in smaller group sizes. Before the translation to the clinical situation can be made, targeted studies will have to be performed in both male and female animals.

The choice to use mice is based on the fact that they are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(5). As such, mice, and in particular the C57BL/6J strain, have been extensively used in studies into the immune system, and a large number of tools and assays are available.

Origin

We will generally obtain our mice from registered EU breeding companies. If mice have a different origin, they will be imported taking all applicable rules of the facility where the experiments will be performed into account.

Estimated numbers

We expect to be able to reach our objectives with a group size of maximally 12 animals.

The estimated maximum number of mice in this procedure is 1296, based on the following (also see flowchart in section A1):

- To evaluate the effects of noradrenaline, we require 36 groups à 432 mice (2X2X3X3 design).
- To evaluate the effects of vasopressin and phenylephrine over noradrenaline, we require 72 groups à 864 mice (2X4X3X3 design).

Please note that this is the maximum numbers of mice. The number will likely be lower, as definitive group size will be based on power calculations, and placebo groups from earlier experiments in this animal procedure might be used in later experiments.

Life stages

Our experiments will be performed in young mice (1.5-6 months old).

1. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. Virulence. 2014;5(1):12-9.
2. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. Cell. 1995;80(3):401-11.
3. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. Endocrinology. 2009;150(8):3877-84.
4. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. Crit Care Med. 1997;25(1):106-10.
5. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(4):1167-72.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57BL/6J mice	registered EU breeding companies	1296	1.5-6 months old

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

Due to the complex nature of the immune system, and the intricate ways through which different subsets immune cells interact *in vivo*, our objectives cannot be achieved without animal studies. To the best of our knowledge, no *in vitro* systems or computer models exists that can accurately mimic the *in vivo* situation. Mice are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(1). Furthermore, a large number of tools and assays are available.

Reduction

Our experiments are designed to keep the numbers of mice used as low as possible. However, to be able to draw firm conclusions, we will need a sufficient group size. Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation. We will make optimal use of the material from each mouse and combine experiments where possible.

Refinement

Placement of the microosmotic pump will be performed under general anesthesia. Mice will only suffer from the LPS-induced inflammatory response for a short period of time (maximum of 8 hours). Furthermore, mice will be deeply anesthetized before they are sacrificed, which is associated with minimal discomfort. All animal procedures will be performed by experienced researchers/biotechnicians/caretakers to keep the discomfort for the mice as low as possible. The procedures used are reported in the literature to yield reliable data. During the course of the project, we will further refine the procedures according to the results obtained. Also, cage enrichment will be used in all experiments.

References

1. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(4):1167-72.

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

In addition to the items mentioned under "refinement", the extra precautions that are taken to reduce discomfort are:

- Mice will be housed together as much as possible. Randomization will be performed as early in the experiments as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows it. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.
- Frequent check-up of the mice before and during the experiments will prevent unnecessary discomfort.

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.

N/A.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Placement of the micro-osmotic pump will be performed under general anesthesia, so this will not result in pain. The wounds from surgery will cause pain.

Development of an inflammatory response after LPS administration will cause (inflammatory) pain. Furthermore, mice will experience some pain caused by the administration of LPS/placebo depending on the route of administration (intraperitoneal, or intravenous). Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized, so this is not accompanied by pain. Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

Pain resulting from surgery can be ameliorated by analgesics. Whether LPS-induced inflammatory pain can be ameliorated by analgesics is nevertheless unknown. Analgesics can influence the immune response. As the pain from surgery will be simultaneous to the inflammatory pain resulting from LPS the benefits of analgesics are therefore not certain, but use of them can confound our results. Therefore, we wish not to use them in these short-term experiments.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Stress
- Discomfort due to surgery
- Illness-related symptoms: solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing
- Recovery from anesthesia

- Euthanasia

Explain why these effects may emerge.

Stress will be induced by transportation of mice to the animal facility, handling before injections, injections, euthanasia, illness.

Surgery will cause discomfort due to ligatures, agraves etc.

Development of an inflammatory response after LPS administration will be accompanied by illness, characterized by solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing.

Mice will experience some discomfort caused by the administration of LPS/placebo depending on the route of administration (intraperitoneal, or intravenous).

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

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatize to their new environment.

In case sutures and/or agraves unexpectedly cause severe ulceration or infection, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal, but it will only occur once. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

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 endpoint are defined as:

- Severe breathing difficulties.
- Abnormal behavior and/or strongly reduced mobility.
- Pre-moribund state and severe suffering.
- Unforeseen complications of surgery, LPS administration, or administration of vasopressors.
- If the animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment (e.g. injuries/wounds/infections).
- If the animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD.
- If (reliable and applicable) results cannot be achieved because of the conditions not related with the experiment.
- The objective of the experiment has been reached.

All above described criteria could be manifested in case of complication of disease. If any of this states is determined, mice will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

Less than 5%.

K. Classification of severity of procedures

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

Moderate for 100% of mice, all mice will undergo surgery for the microosmotic pump placement. Mice that receive LPS will have additional discomfort due to the inflammatory response, but this will not reach the "severe" classification.

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.

Mice need to be killed for harvesting of organs to evaluate our endpoints.

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

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

| Yes _____

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>CLP model for immunoparalysis</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	CLP model for immunoparalysis
Serial number	Type of animal procedure					
2	CLP model for immunoparalysis					

2 Description of animal procedures

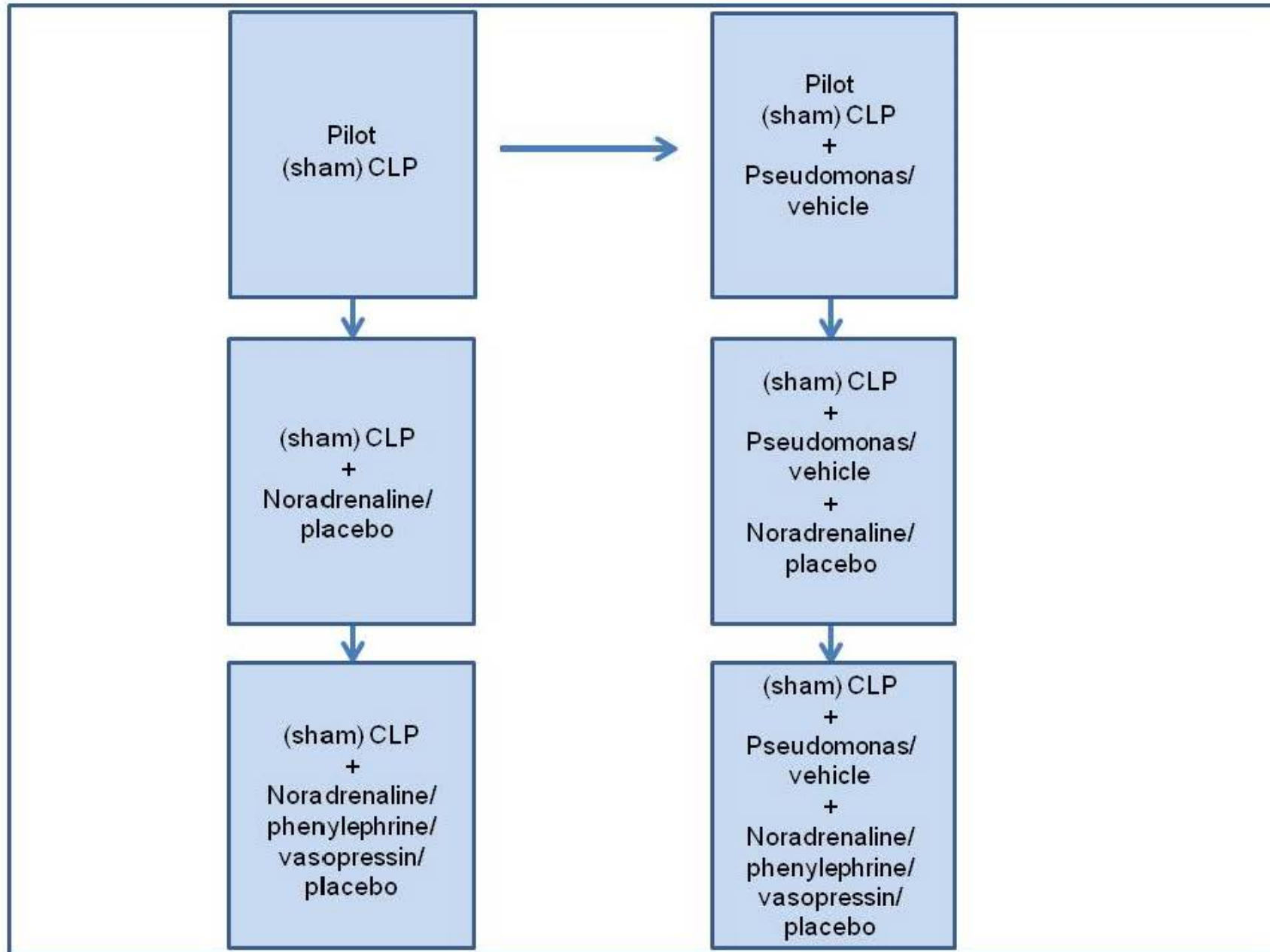
A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This animal procedure is aimed at investigating the contribution of noradrenaline to the development of immunoparalysis and the putative superior effects of vasopressin and/or phenylephrine. This will be evaluated in both primary infection, for which we will use the cecal ligation and puncture model (CLP, the gold standard model of sepsis (1)), and secondary infection, for which mice will be infected with *Pseudomonas Aeruginosa* after CLP. *Pseudomonas Aeruginosa* is one of the most prevalent causative organism of secondary pneumonia in sepsis patients)(1, 2). A detailed description of the procedures is provided in section A2.

As the CLP and CLP+*Pseudomonas* models are currently not operational in our institute, we will set up these models in pilot experiments. By the time this AP is executed, we will have experience with the micro-osmotic pump, as it has been used in the previously performed animal procedure 1. The flowchart of this animal procedure including go/no-go points (indicated by arrows) is provided below. We will start with pilot experiments to set up the CLP model. We will make use of a maximum of 3 different puncture sizes, which corresponds to 3 different grades of severity, to identify the optimal grade of severity. We will start with the puncture size previously described by a collaborating group (1) and only use other sizes when this size does not fit our needs. Once the CLP model is set-up, experiments in which we evaluate the effects of noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP) will be carried out. If we demonstrate that noradrenaline indeed contributes to immunoparalysis in primary infection, we will subsequently move on to the experiments in which phenylephrine and/or vasopressin are compared with noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP).

After the successful setup of the CLP model, we will also start pilot experiments to set up the CLP+*Pseudomonas* model using a maximum of 3 different dosages of *P. Aeruginosa* to identify the optimal infection dose. Subsequently, the effects of noradrenaline and subsequently (only if noradrenaline indeed contributes to immunoparalysis in secondary infection) alternative vasopressors will be determined in the combination model (CLP+*Pseudomonas*).



Primary outcome parameter:

- Bacterial load in blood/tissues to assess clearance and thus susceptibility towards the infection as a functional measure of immunoparalysis.

Secondary outcome parameters:

- Flow cytometric analysis of different cell populations obtained from blood/tissues to assess cell surface markers and functionality (the latter after *ex vivo* restimulation). This will provide whether or not immunoparalysis is present and, if so, in what compartments.
- Pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma and various tissues, to measure local and systemic inflammatory effects.
- Gene expression profiles in various tissues.
- Histology of various tissues.
- Markers of organ damage (MPO, creatinin, urea, AST, ALT etc.), measured in blood/tissues.
- Clinical parameters: Weight, body temperature, ruffled coat, hunched back, reduced mobility, and moribund state.

References

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.

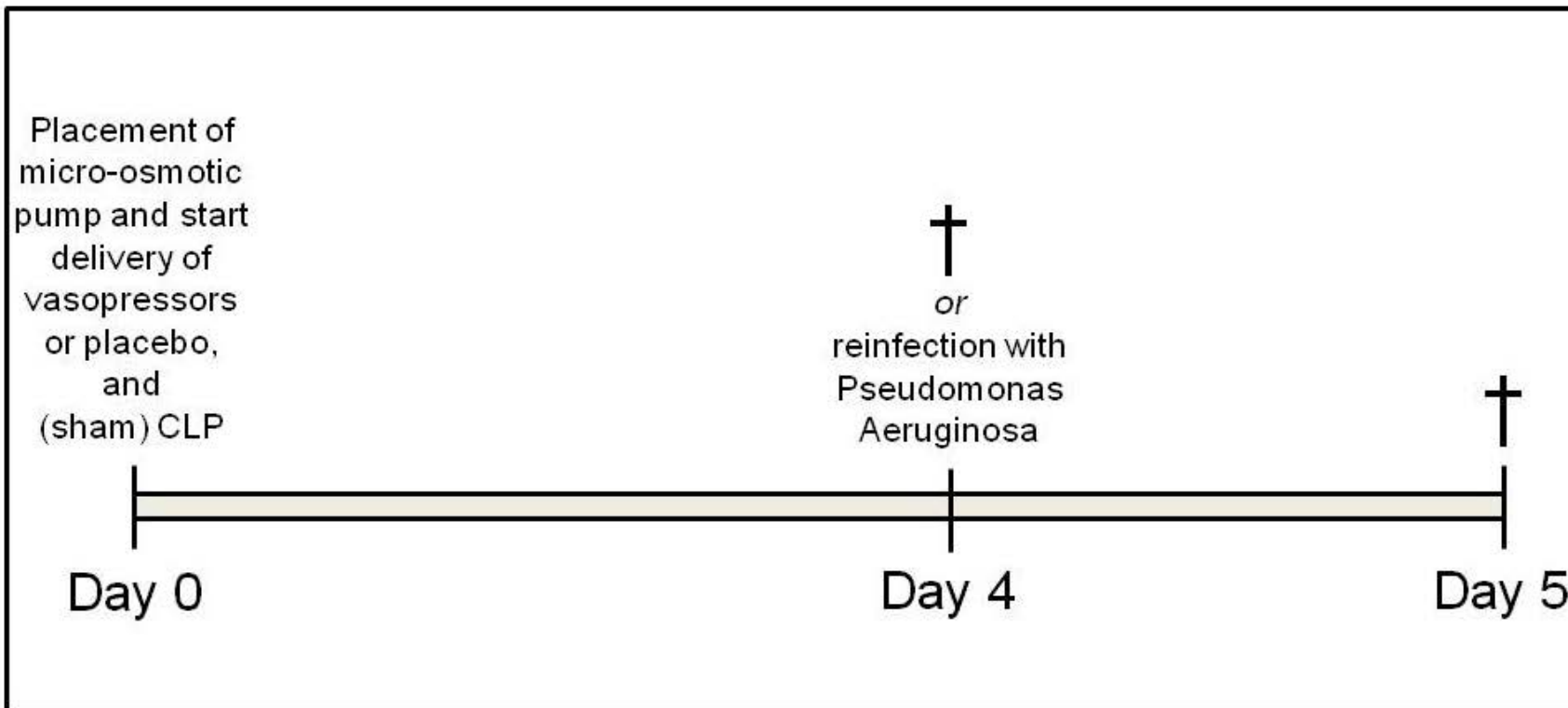
Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

A schematic overview of the procedures (including all possible elements) is provided in the figure at the bottom of this section.

At day 0, mice will be anesthetized with isoflurane, a small incision will be made on the back of the mice, and the micro-osmotic pump will be placed subcutaneously and connected to the jugular vein for the continue infusion of vasopressors or placebo. Immediately afterwards, mice will undergo CLP. In more detail, the cecum of mice will be ligated and perforated to allow the release of fecal material into the peritoneal cavity, generating a polymicrobial infection that spreads systemically. Sham mice will undergo the same surgical procedure without ligation or puncture (sham).

At day 4, mice will be either:

- Deeply anesthetized with isoflurane for exsanguination through orbital extraction followed by cervical dislocation, after which blood and organs will be harvested. This elucidates the role of vasopressors in primary infection.
- Reinfected with *Pseudomonas Aeruginosa* to elucidate the role of vasopressors in secondary infection. For this, mice will be anesthetized with isoflurane and infected intranasally with placebo (saline) or *Pseudomonas Aeruginosa*. 24 hours post-infection, mice will be deeply anesthetized with isoflurane for exsanguination through orbital extraction followed by cervical dislocation, after which blood and organs will be harvested.



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

The number of mice required to obtain statistical significance will be calculated using power calculations based on data from literature (1) and previous experiments. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations. Naturally, during the course of this project, we will make use of the data obtained to further optimize the power calculations to prevent the use of too many or too little mice to reach our objectives. Power will be set at 80%, and alpha at 0.05. When required, Bonferroni correction will be used to correct for multiple testing.

The type of statistical tests used for analysis of the data obtained from this procedure is dependent on the nature of the data. For instance, cytokine levels between groups will be compared with unpaired t-tests or Mann-whitney U tests (2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively), or one-way analysis of variance or Kruskal-Wallis with the appropriate post-hoc tests (more than 2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively).

References

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.

B. The animals

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

Species Similar all our other experiments within this project, we will primarily make use of wild-type male C57BL/6J mice, aged 6-8 weeks. We use the male sex, because male mice do not have a variation in the hormonal cycle like female mice which affects the inflammatory response. It is well-known that in patients, gender influences the immune response during sepsis (recently reviewed in (3)). Women display better outcome of sepsis compared with men, and this is ascribed to sex hormones (3). Furthermore, in the LPS (4, 5) and CLP (6) models in mice, immunologic effects of sex hormones and differences between the sexes have been demonstrated. Therefore, the interindividual variation is expected to be lower when we only use male mice, which in turn results in smaller group sizes. Before the translation to the clinical situation can be made, targeted studies will have to be performed in both male and female animals.

The choice to use mice is based on the fact that they are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(7). As such, mice, and in particular the C57BL/6J strain, have been extensively used in studies into the immune system, and a large number of tools and assays are available.

Origin

We will generally obtain our mice from registered EU breeding companies. If mice have a different origin, they will be imported taking all applicable rules of the facility where the experiments will be performed into account.

Estimated numbers

We expect to be able to reach our objectives with a group size of maximally 20 animals (based on a literature (1)) . The estimated maximum number of mice in this procedure is 960, based on the following (also see flowchart in section A1):

- To set up the CLP model (evaluation of effects of different puncture sizes in CLP [maximum of 3]), we require 4 groups à 80 mice (sham + CLP with 3 different puncture sizes).
- To set up the CLP+Pseudomonas Aeruginosa model (evaluation of different dosages of Pseudomonas Aeruginosa [maximum of 3]), we require 8 groups à 160 mice (2X4 design).
- To evaluate the effects of noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP), we require 4 groups à 80 mice (2X2 design).
- To evaluate the effects of noradrenaline during secondary infection (CLP/sham CLP followed by Pseudomonas Aeruginosa or vehicle), we require 8 groups à 160 mice (2X2X2 design).
- To evaluate the putative superior effects of vasopressin and phenylephrine over noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP), we require 8 groups à 160 mice (2X4 design).
- To evaluate the effects of the putative superior effects of vasopressin and phenylephrine over noradrenaline during secondary infection (CLP/sham CLP followed by Pseudomonas Aeruginosa or vehicle), we require 16 groups à 320 mice (2X2X4 design).

Please note that these are maximum numbers of mice. The numbers will likely be lower, as we have various go/no-go points, definitive group size will be based on power calculations, and sham/placebo groups from earlier experiments in this animal procedure might be used in later experiments. Furthermore, we will only use both vasopressin and phenylephrine if these alternative vasopressors show equally less immunosuppressive effects compared with noradrenaline in AP1 of this project. Otherwise, only the least immunosuppressive alternative will be used.

Life stages

Our experiments will be performed in young mice (1.5-6 months old).

References

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.
3. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2014;5(1):12-9.
4. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 1995;80(3):401-11.
5. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology*. 2009;150(8):3877-84.
6. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med*. 1997;25(1):106-10.
7. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):1167-72.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57BL/6J mice	registered EU breeding companies	960	1.5-6 months old

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

Due to the complex nature of the immune system, and the intricate ways through which different subsets immune cells interact *in vivo*, our objectives cannot be achieved without animal studies. To the best of our knowledge, no *in vitro* systems or computer models exists that can accurately mimic the *in vivo* situation. Mice are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(3). Furthermore, a large number of tools and assays are available.

Reduction

Our experiments are designed to keep the numbers of mice used as low as possible. However, to be able to draw firm conclusions, we will need a sufficient group size. Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery. In case necessary, a biostatisticaion will be involved in the power calculation. We will make optimal use of the material from each mouse and combine experiments where possible.

Refinement

Surgery for CLP, placement of the micro-osmotic pump, as well as infection with *Pseudomonas Aeruginosa* will be performed under general anesthesia, so this will not result in major discomfort. The polymicrobial infection cause by CLP and the pneumonia caused by *Pseudomonas Aeruginosa* will last for a relatively short period of time (4 days and 24 hours, respectively). Furthermore, mice will be deeply anesthetized before they are sacrificed, which is associated with minimal discomfort. All animal procedures will be performed by experienced researchers/biotechnicians/caretakers to keep the discomfort for the mice as low as possible. The procedures used are reported in the literature to yield reliable data. During the course of the project, we will further refine the procedures according to the results obtained. Also, cage enrichment will be used in all experiments. Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached. Those mice will not be replaced.

References

3. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):1167-72.

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

In addition to the items mentioned under “refinement”, the extra precautions that are taken to reduce discomfort are:

- Mice will be housed together as much as possible. Randomization will be performed as early in the experiments as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows it. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.
- Frequent check-up of the mice before and during the experiments will prevent unnecessary discomfort.

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.

N/A.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

CLP, placement of the micro-osmotic pump, and Pseudomonas Aeruginosa infection will be performed under general anesthesia, so this will not result in major pain. The wounds from surgery and development of infection after CLP and Pseudomonas Aeruginosa infection will cause (inflammatory) pain. Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized, so this is not accompanied by pain. Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

Pain resulting from surgery can be ameliorated by analgesics. Whether CLP- or Pseudomonas Aeruginosa-induced inflammatory pain can be ameliorated by analgesics is nevertheless unknown. Analgesics can influence the immune response. As the pain from surgery will be simultaneous to the inflammatory pain resulting from the infection, the benefits of analgesics are therefore not certain, but use of them can confound our results. Therefore, we wish not to use them in these short-term experiments.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Stress
- Discomfort due to surgery
- Illness-related symptoms: solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing
- Recovery from anesthesia
- Euthanasia

Explain why these effects may emerge.

Stress will be induced by transportation of mice to the animal facility, handling before surgery, (recovery from) inhalation anesthesia, injections, euthanasia, illness.

Surgery will cause discomfort due to ligatures, agraues etc.

Development of infection after CLP and Pseudomonas Aeruginosa infection will be accompanied by severe illness, characterized by solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing.

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

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatize to their new environment.

In case sutures and/or agraues unexpectedly cause severe ulceration or infection, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

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.

Mice will be monitored daily, weighed, temperature recorded (non-invasive) and scored according their condition using a Scoring and Weight sheet (used parameters are: weight, body temperature, ruffled, coat, hunched back, reduced mobility, and moribund).

Humane endpoint are defined as:

- Loss of body weight of more than 15% in 1-2 days or more than 20% from the start of the experiment, according to the international guidelines of humane endpoints.
- Severe breathing difficulties.

- Abnormal behavior and/or strongly reduced mobility.
- Pre-moribund state and severe suffering.
- Unforeseen complications of surgery or infections, or administration of vasopressors.
- If the animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment (e.g. injuries/wounds/infections).
- If the animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD.
- If (reliable and applicable) results cannot be achieved because of the conditions not related with the experiment.
- The objective of the experiment has been reached.

All above described criteria could be manifested in case of complication of disease. If any of this states is determined, mice will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

Less than 10%.

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).

Moderate for 33% of mice à groups that undergo sham CLP and are not infected with Pseudomonas. These will still undergo surgery.
Severe for 67% à CLP and/or Pseudomonas infections.

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.

Mice need to be killed for harvesting of organs to evaluate our endpoints.

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

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

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0118
2. Titel van het project: The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis
3. Titel van de NTS: De bijdrage van noradrenaline aan verlamming van het afweersysteem bij bloedvergiftiging
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-12-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 11-01-2016 en 02-02-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-01-2016 tot 25-01-2016 en van 09-02-2016 tot 10-02-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 10-02-2016
 - advies aan CCD: 24-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 18-01-2016
 - Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-2.1 De commissie is van mening dat het beschreven onderzoek niet translationeel maar basaal onderzoek is naar de mechanismen achter de verminderde afweer bij IC patiënten. De experimenten in dierproef 4 en 5 zullen een bevestiging kunnen geven van de gevonden resultaten, maar zijn te summier om te kunnen spreken van translationeel onderzoek.

-3.1 Er zijn meerdere factoren die bijdragen aan de verminderde afweer bij IC patiënten. Waarom kiezen de onderzoekers voor deze éne mediator (PDL1-positieve neutrofielen), deze éne conditie (hypoxie), en dit éne medicijn (noradrenaline)? En wat is de samenhang tussen deze drie factoren in relatie tot de verminderde afweer? Indien deze factoren niet onderling samenhangen, dan vraagt de DEC zich af of deze aanvraag beschouwd kan worden als een toetsbare eenheid.

-3.2 De hoofddoelstelling is een algemene doelstelling, waarvan het lastig te voorspellen is of die behaald zal worden met dit onderzoek. De tweede doelstelling betreft toepassing in de kliniek en ligt nog erg ver van de eerste doelstelling af, waardoor de haalbaarheid daarvan vrijwel niet in te schatten is door de commissie. Ook het formuleren van 10 subdoelstellingen draagt niet bij tot de overzichtelijkheid. De onderzoekers worden verzocht een goed afgebakende doelstelling te formuleren, en de haalbaarheid van die doelstelling binnen de looptijd van het project toe te lichten. De commissie betwijfelt of de subdoelstellingen die opgesomd worden bij het onderdeel 'hypoxia' in 5 jaar haalbaar zijn.

-3.4.2 De onderzoekers gebruiken voor dierproef 2 en 3 het LPS-model, terwijl voor dierproef 1 het CLP-model wordt gebruikt. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij verschillende modellen willen gebruiken en niet alleen het 'golden standard model' voor sepsis?

-3.4.3 Dierproef 1, 2 en 3 starten parallel, hetgeen impliceert dat er geen onderlinge samenhang is. De aanvragers verwijzen voor een schematisch overzicht van de samenhang tussen de verschillende dierproeven naar het schema bij 3.4.1. Deze figuur lijkt echter de afwezigheid van enige samenhang of onderlinge beïnvloeding tussen de drie onderzochte factoren in respectievelijk AP1, AP2/AP4, en AP3/AP5 te bevestigen. De genoemde 'cross-over' elements (laatste alinea) waaruit de samenhang zou kunnen blijken, zijn onvoldoende toegelicht. Wanneer het drie onafhankelijke onderzoekslijnen betreft, kunnen de onderzoekers dan een hiërarchie aanbrengen? Welke hypothese is het meest kansrijk en zou als eerste onderzocht moeten worden? Wat zijn de overwegingen om de volgende hypothese te gaan onderzoeken? Bij parallelle uitvoering worden de onderzoekers verzocht duidelijker uit te leggen waaruit de onderlinge samenhang bestaat (zie ook de vraag over 3.1).

Description of Animal Procedures:

DAP1

-A1: De commissie mist een duidelijke toelichting op de flowchart, met onder andere een beschrijving van de overwegingen bij de go/no go momenten. Op zichzelf staand vindt de commissie de figuur op p3/64 onbegrijpelijk.

-B: De onderzoekers willen uitsluitend mannen gebruiken voor hun dierproeven, omdat vrouwen een hormonale cyclus hebben die de afweerreactie zou kunnen beïnvloeden. Kunnen de onderzoekers literatuurreferenties geven waaruit deze beïnvloeding blijkt? Zij zouden in het genoemde pilot experiment kunnen uitzoeken of er verschillen in immuunrespons optreden tussen mannen en vrouwen in dit model.

-J en K: De beschreven mortaliteit en morbiditeit komen niet overeen met de gegeven referentie (de Haan et al). Hieruit blijkt dat deze procedure leidt tot 20% mortaliteit/HEP en tot ernstige ziekte bij alle dieren die CLP ondergaan (all mice showed signs of severe illness within 24 h after CLP). De commissie is van mening dat alle dieren in de CLP-groepen ernstig

ongerief zullen ondervinden, ook al is dat van voorbijgaande aard. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.

Uit tijdsoverwegingen heeft de commissie besloten de andere bijlagen met dierproeven en de niet-technische samenvatting nog niet tot in detail te bespreken. De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op de andere dierproeven en deze waar nodig aan te passen.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-2.1 Ik ben het eens met de commissie en heb het type onderzoek gewijzigd naar “basaal onderzoek”.

-3.1 Naar aanleiding van deze opmerking van de commissie heb ik besloten in deze aanvraag de onderdelen PD-L1 en hypoxie weg te laten en deze eventueel in toekomstige aanvragen te verwerken. Nu bestaat de aanvraag slechts uit onderzoek naar effecten van noradrenaline en alternatieve vasopressors op sepsis-geïnduceerde immunoparalyse. Hier zijn ook geen behandelexperimenten in opgenomen. We onderzoeken slechts de effecten van meerdere vasopressors.

-3.2 Omdat ik in het herziene project de onderdelen PD-L1 en hypoxie heb weggelaten is de doelstelling veel specifiek geworden en de haalbaarheid vergroot.

-3.4.2 In het herziene projectvoorstel wil ik wederom zowel het LPS als het CLP (+ Pseudomonas) model toepassen. Hier is nu ook een duidelijke fasering in aangebracht. Eerst zullen de immunomodulerende effecten van de verschillende vasopressors onderzocht worden in het (veel minder belastende) LPS model. Deze informatie zal dan worden gebruikt om de experimenten in de meer klinisch relevante maar ook meer belastende CLP (+ Pseudomonas) modellen vorm te geven. Dit staat nu uitgebreid beschreven in het projectvoorstel.

-3.4.3 Dit is niet meer van toepassing omdat ik de onderdelen PD-L1 en hypoxie heb weggelaten.

Description of Animal Procedures:

-A1: Dit is alleen van toepassing op AP2, omdat hier nog go/no-go momenten in het AP zitten. Ik heb daar een duidelijke toelichting met de overwegingen voor de go/no-go punten toegevoegd.

-B: In mensen heeft geslacht effecten op de afweerreactie tijdens sepsis, dit is in verscheidene studies aangetoond (recent gereviewd in (1)). Vrouwen hebben een betere outcome van sepsis dan mannen, en dit wordt toegeschreven aan geslachtshormonen. Ook in experimentele modellen in muizen (waaronder het LPS model (2, 3) en CLP (4)) zijn immunologische effecten van geslachtshormonen en verschillen tussen de geslachten aangetoond. Het gebruiken van beide geslachten zou dus leiden tot meer variatie en het gebruik van (veel) grotere groepen. Veder, om dezelfde redenen als hierboven aangegeven, maken we bij het LPS model bij de mens wat we op onze afdeling loopt, ook alleen gebruik van mannen. We willen de resultaten uit dit dierexperimentele project vertalen naar de mens, onder andere gebruik makend van het LPS model bij de mens. Daarom hebben we

gekozen om alleen mannelijke dieren te gebruiken in dit project. We hebben dit verwerkt in de APs. Het is echter niet te verwachten dat de effecten van de interventies heel verschillend zijn tussen mannen en vrouwen. Uiteindelijk is het doel om een klinische studie te doen bij patiënten met sepsis, deze zal zowel mannen als vrouwen includeren.

-J en K: We zijn het eens met de commissie en hebben dit aangepast. Verder hebben we de groepsgrootte voor de CLP (+Pseudomonas) experimenten aangepast aan de hand van de studie van de Haan et al (5).

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 09-02-2016

- Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

-3.5: Vijf dagen ernstig ongerief is niet kort. De commissie adviseert u dit weg te laten.

-4.4 De maatregel om ongerief voor de dieren te beperken is voor leken niet begrijpelijk beschreven.

Project Proposal:

-3.1 Wat is de rationale voor de keuze van vasopressin en fenylefrine? Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij minder immuunsuppressie verwachten van deze middelen waarbij de receptoren en onderliggende signaling pathways voor beide middelen worden betrokken?

-3.4.3 De onderzoekers willen vaststellen of noradrenaline in vivo een immuunsuppressief effect heeft. Wanneer noradrenaline geen immuunsuppressief effect heeft, is er geen reden om de proeven met vasopressine en fenylefrine in het LPS model uit te voeren. De commissie is van mening dat dit ook een go/no go moment voor dit onderzoek inhoudt, en verzoekt de onderzoekers dit toe te voegen aan de figuur op pagina 9/11 en in sectie 3.4.2 waar de opzet van dierproef 1 wordt beschreven.

-3.4.3 De commissie vindt de huidige benaming van de dierproeven wat verwarrend. Zij adviseert de onderzoekers een eenvoudiger variant te gebruiken, zoals: 'LPS model for immunosuppression' voor AP1 en 'CLP model for immunoparalysis' voor AP2.

Description of Animal Procedures:

DAP1

-A2: Wat is de dosering van het LPS en op welke wijze wordt het geïnjecteerd? Het effect van LPS is sterk dosisafhankelijk en heeft consequenties voor het ongerief van de dieren en de frequentie van humane eindpunten.

-B: De Commissie adviseert u de zin 'We feel that the use... such as ours' hier en ook in DAP2 te verwijderen.

-K: Het ongerief volgend op de toediening van LPS ontbreekt nog in de beschrijving.

DAP2

-A1: In het genoemde model is de grootte van de naald al vastgelegd. Waarom willen de onderzoekers drie verschillende laesiegroottes onderzoeken? De commissie is van mening dat het effect van de grootte van de laesie in het coecum al eerder vastgesteld is.

- Datum antwoord: 10-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.1 Zoals beschreven in sectie 3.1, alinea “noradrenaline and immunoparalysis”, worden de immuussuppressieve effecten van (nor)adrenaline gemedieerd door beta-adrenerge receptoren (de effecten worden namelijk teniet gedaan door beta-blokkers). Vasopressine en fenylefrine werken niet via beta-adrenerge receptoren: vasopressine grijpt aan op V1 en V2 receptoren, en fenylefrine is een selectieve alfa-adrenerge receptoragonist. Van stimulatie van deze receptoren is niet bekend dat ze het immuunsysteem remmen. Ik heb dit nu verduidelijkt in sectie 3.1.

-3.4.3 Ik ben het eens met de commissie en heb dit go/no-go moment toegevoegd alsmede de figuur op pagina 9/11. De text in sectie 3.4.2 heb ik niet gewijzigd omdat deze niet verandert, de go/no-go punten staan hier namelijk niet vermeld (ook niet bij AP2). Wel heb ik sectie DAP1 aangepast en hierin tevens een flowchart toegevoegd met het go/no-go moment.

-3.4.3 Akkoord, ik heb dit aangepast.

Description of Animal Procedures:

DAP1

A2: Mij is verteld dat dit detailniveau (doseringen) niet noodzakelijk is in projectaanvragen. Edoch, er zal gebruik gemaakt worden van 5 mg/kg LPS. Dit hebben we in al onze voorgaande experimenten gebruikt en is in overeenstemming met het beschreven ongerief. Ik heb dit nu vermeld in DAP1.

B: Akkoord, ik heb deze zin verwijderd.

K: Ik heb het ongerief tengevolge van LPS toediening toegevoegd.

DAP2

A1: De grootte van de naald/laesie staat alleen in de literatuur beschreven. Wij hebben dit model nog nooit uitgevoerd in ons centrum en het effect van verschillende laesiegroottes dus nog niet vastgesteld. Zoals u waarschijnlijk weet is er grote variatie in uitkomsten in verschillende settings. Daarom willen we bij het opzetten van dit model de vrijheid behouden om het model in onze setting te optimaliseren door gebruik te kunnen maken van drie laesiegroottes. We zullen echter wel starten met de laesiegrootte zoals beschreven in de literatuur. Deze laatste overweging heb ik toegevoegd aan DAP2.

Niet-technische samenvatting:

3.5: Akkoord, ik heb dit verwijderd.

4.4 Ik heb dit nu begrijpelijker opgeschreven.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies

- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to identify whether noradrenaline contributes to sepsis-induced immunoparalysis in animal models that are relevant to the critically ill patient, and if the alternative vasopressors phenylephrine and/or vasopressin are superior in this respect.' De te behalen onderzoekresultaten zullen duidelijk maken of noradrenaline de afweer onderdrukt in muismodellen voor sepsis. Indien dit het geval is, zal onderzocht worden of fenylefrine en vasopressine de afweer in gelijke mate onderdrukken in deze modellen. Sepsis komt regelmatig voor (bij 20 miljoen patiënten per jaar wereldwijd). Dit kan leiden tot een septische shock, waaraan 30% van de patiënten overlijdt. Het verlamde afweersysteem van sepsis-patiënten is meestal de oorzaak van een fatale afloop. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat duidelijk wordt of een middel dat standaard gegeven wordt bij septische shock bijdraagt aan de fatale verlamming van het immuunsysteem, en of alternatieve middelen deze bijwerking niet hebben. De DEC acht het verbeteren van de behandeling van sepsis-patiënten van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep en haar (internationale) samenwerkingspartners hebben veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. Er is voldoende financiering voor het uitvoeren van dit onderzoeksvoorstel en de translatie van positieve resultaten naar de kliniek. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare inzichten in het effect van vasopressoren op het verloop van primaire en secundaire infecties bij muismodellen voor sepsis.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het sepsis-model. Het ongerief als gevolg van het verbloeden onder anesthesie schat de commissie in als licht. De DEC schat het ongerief als gevolg van de operatie om de mini-osmotische pomp te plaatsen en van de injectie met LPS in als matig. De commissie schat het ongerief als gevolg van de punctie van het coecum en de intranasale infectie met *Pseudomonas* in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 65% van de dieren en ernstig voor 35% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of

door gebruik van minder complexe diersoorten. Het effect van medicijnen op de afweer tegen sepsis of longontsteking kan niet goed onderzocht worden zonder proefdieren. Het immuunsysteem van muizen lijkt voldoende op het immuunsysteem van mensen, waardoor de resultaten vertaalbaar zijn naar patiënten.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door experimenten waar mogelijk te combineren en door het inbouwen van een aantal goed omschreven go/no go momenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 2256 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Effecten zullen eerst in een minder belastend diermodel worden onderzocht. De onderzoekers zullen het meer belastende diermodel alleen gebruiken indien er positieve resultaten in het minder belastende model worden gevonden. Door de korte looptijd van de experimenten wordt het ernstig ongerief zoveel mogelijk beperkt. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het effect van vasopressoren op het verloop van primaire en secundaire infecties bij muismodellen voor sepsis. Het belang van meer inzicht in het ontstaan van een verlamd immuunsysteem bij sepsispatiënten acht de DEC substantieel, gezien de prevalentie van deze ernstige ziekte en de hoge mortaliteit van septische shock.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 65% van de dieren matig ongerief en 35% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aangebrachte sepsismodel en de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016447

Bijlagen

2

Datum 25 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016447. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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: 24 maart 2016
Geplande einddatum: 24 maart 2021
Titel project: Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options
Titel niet-technische samenvatting: Een verlamd afweersysteem in ernstig zieke patiënten; bijdragende factoren en behande
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

24 februari 2016



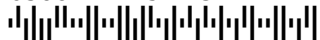
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016447

Bijlagen

2

Datum 25 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 februari 2016

Vervaldatum: 26 maart 2016

Factuurnummer: 16700447

Ordernummer: 040823-461220/2015-0118/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016447	€ 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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 4 april 2016 13:48
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Uw aanvraag AVD103002016447
Bijlagen: 2015-0118NTS.pdf

LS,

Dank voor de beoordeling en uw geringe commentaar. Bij deze de aangepaste NTS.

MvG

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Radboud university medical centre

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]

Geert Grooteplein 10 [REDACTED]

www.radboudumc.nl

In office: monday to friday 09.00 – 17.00

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 4 april 2016 9:05
Aan: [REDACTED]
CC: Postbus instantie voor dierenwelzijn
Onderwerp: Uw aanvraag AVD103002016447

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag tot projectvergunning getiteld Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options met aanvraagnummer AVD103002016447 besproken in de vergadering. De CCD is voornemens uw projectaanvraag te vergunnen. Voor dat de vergunning verstuurd wordt willen wij u vragen een zin uit uw Niet Technische Samenvatting te herformuleren. U gebruikt in de NTS bij punt 4.2 vermindering de uitdrukking "als er muziek in zit" dit vind de commissie ongelukkig gekozen in de context van de wetenschappelijke achtergrond en dierproeven. Zou u ons een herziene versie van de NTS willen sturen?

Zodra de NTS is ontvangen sturen wij de vergunning aan u toe.

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

p/a
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016447

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 7 april 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 24 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options" met aanvraagnummer AVD103002016447. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 april 2016 hebben wij u gevraagd om een zin uit de Niet Technische samenvatting te herformuleren. Op 4 april 2016 heeft u een aangepaste NTS ingediend.

De titels van de projectvoorstel en de NTS komen niet overeen met de titels zoals genoemd op het aanvraagformulier. De titel genoemd op de project voorstel en het DEC advies is: 'The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis'. Wilt u bij vervolgaanvragen erop toezien dat de titels op de aanvraag en de overige documenten overeen komen?

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 april 2016 tot en met 24 maart 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt. Aanvullend stelt de CCD twee algemene voorwaarden om te voldoen aan datgene wat voort komt uit artikel 10a. van de wet.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden wegens ongerief classificatie ernstig, 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.

Datum
7 april 2016

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016447

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij nemen het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

In aanvulling hierop worden de twee algemene voorwaarden gesteld die aan meerjarige projecten worden verbonden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum
7 april 2016

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016447

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 gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.


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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101, [REDACTED]
Postcode en woonplaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 april 2016 tot en met 24 maart 2021, voor het project "Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options" met aanvraagnummer AVD103002016447, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 februari 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 4 april 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 24 februari 2016, ontvangen op 24 februari 2016;

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
LPS model for immunosuppression	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J mice	1296	Matig
CLP model for immunoparalysis	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J mice	960	67% Ernstig 33 % matig

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2022 plaatsvinden.

Algemene voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken 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

Datum

7 april 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002016447

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 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Beoordeling achteraf

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

Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2022 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 19 april 2016 16:18
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit AVD103002016447

Geachte leden van RU DEC,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project : The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis met aanvraagnummer AVD103002016447.

De CCD heeft op basis van uw advies besloten de aanvraag te vergunnen. Ook conform uw advies is aan deze vergunning de verplichting verbonden tot het indienen van een beoordeling achteraf vanwege de ongeriefclassificatie ernstig.

De CCD dankt u voor uw uitgebreide advies,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)