

	Inventaris Wob-verzoek W16-16S								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016462								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x			x	
5	DEC-advies				x			x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail verzoek aanvulling 18-4-2016				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling DEC 10-5-2016				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl 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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30244197</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td></td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde		KvK-nummer	30244197	Straat en huisnummer		Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																		
KvK-nummer	30244197																	
Straat en huisnummer																		
Postbus	12007																	
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																	
IBAN	NL27INGB0000425267																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

- 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
- 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
- Einddatum
- 3.2 Wat is de titel van het project?
-
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
-
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,- 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
- ☒

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De 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

Datum

Handtekening

Utrecht
 29-03-2016



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. UMC Utrecht
- 1.3 Provide the title of the project. Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

General background and rationale for research on cardiorenal syndrome:

Heart failure (HF) is a growing worldwide health epidemic and associated with a high mortality and morbidity. It is seen as an abnormality of the function or structure of the heart causing an

inability to sufficiently meet the metabolic requirements of the body. Heart function is defined as the amount or the percentage of blood that is ejected out of the ventricles with each single contraction, also known as the ejection fraction (EF). The EF percentage gives an indication of which type of HF a person has. Two types of HF are distinguished, the first one is heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF, EF <45-50%; also termed systolic heart failure) in which the left ventricle no longer contracts with enough force so less blood is ejected out of the ventricles with each contraction. A main feature of HFrEF is eccentric remodelling (i.e. dilation of the left ventricle) that is commonly seen after a myocardial infarction in which direct injury of the cardiomyocytes takes place and formation of fibrotic tissue subsequently follows. The second type is heart failure characterized by a preserved ejection fraction (HFpEF, EF >45-50%; also termed as diastolic heart failure) and abnormal diastolic function, usually with concentric remodelling or hypertrophy.

A clinical marker used for diastolic function (relaxation) is the mitral flow velocity (E/A ratio) measured via Doppler echocardiography. The atria transfer blood to the ventricle in 2 phases: during the early phase (E wave) the weight of the blood causes it to pass into the ventricles passively while during the late phase the remaining blood is ejected into the ventricles via atrial contraction (A wave). The relative contribution of each is then expressed as the E/A. In healthy individuals the majority of blood is transferred to the ventricles during early phase. A more sensitive measure for the diastolic function includes the E/E', which is the ratio between the early mitral inflow velocity (E wave) and early diastolic velocity of mitral annulus (E'; myocardial relaxation) [1]. The E/E' ratio is of great importance for the prediction of the left ventricular filling pressure. An increase in this ratio is found in diastolic heart failure.

In HFpEF the heart contracts normally, but due to stiffness of the ventricles they can no longer properly relax [2-4]. Less blood is then able to enter the ventricles during diastole (relaxation) so the duration of the relaxing phase is longer in HFpEF, in this case the EF may be normal. During physical exercise, the heart is therefore not able anymore to meet the requirement of the body to pump more blood and symptoms may be unmasked. Almost 50% of all HF patients demonstrate symptoms of heart failure in the presence of a preserved EF.

To summarize, the EF is reduced in HFrEF due to a reduced contractile response of the left ventricle causing less blood to be ejected out of the heart during each contraction. In contrast, in HFpEF the EF is preserved, but the diastolic function is impaired due to stiffness of the ventricles. At rest this will not cause many problems, however during exercise symptoms will emerge.

Until now the most attention has been paid to the causes and many therapeutic interventions have been developed for HFrEF, however less is known about HFpEF. Like HFrEF, HFpEF is associated with high mortality: in-hospital mortality rates ranges from 3.0 to 6.5%, whereas short term (30-90 days) and long term mortality (5 years) rates range from 5.0-9.5% and 55-74% respectively [5]. An improved mechanistic understanding would improve the development of new therapeutics but this is complicated by the heterogeneity of the patient population. The HFpEF population is characterized by multiple comorbidities such as obesity, diabetes, hypertension and chronic kidney disease (CKD) [6, 7]. A worsened renal function or CKD is highly prevalent in HFpEF, in approximately 26-53% of the patients [8]. The combination of CKD and HFpEF is also considered as the **metabolic cardiorenal syndrome** (CRS). The importance of the connection between renal function and HF is increasingly acknowledged among both cardiologist and nephrologists as in a substantial population of HF patients also suffering from CKD, the renal dysfunction is a strong predictor in HF prognosis. Vice versa, CKD is associated with an increased risk of cardiac mortality

[9-14]. Even in early stages of CKD (1 and 2), the risk for HF and mortality is augmented by 10- to 30-fold. In later stages of CKD (3 and 4) the risk of HF mortality is even higher than the risk of reaching end-stage renal disease (ESRD) and the requirement of renal transplant, accounting for 40-50% of all death in this particular patient group. In ESRD, the risk of cardiac death is increased by more than 10-fold in comparison to age and gender matched controls in the general population. Consequently, the prevention of the onset and progression of HFpEF is a major issue for patients suffering from CKD.

Rationale for mechanistic research on metabolic CRS: Despite much information on the incidence and symptoms of CRS, little is known about the molecular drivers of CRS in general and of metabolic CRS in particular. Thus, symptoms can be treated, but we cannot successfully combat the relentless progress of the syndrome. We hypothesize (see figures in section 3.2) that functional and structural changes in the microvasculature (capillaries) precede the development of the first phase of heart failure, namely HFpEF. In this phase the heart dilates and hypertrophies in order to maintain cardiac output per stroke (EF). This adaptation results in inadequate diastole and hence increasing end-diastolic pressure within the ventricles. When HF progresses systolic function is also compromised and HF progresses towards HFrEF. Importantly, while treatment options and subsequent clinical outcome have been improved over the years in patients with HFrEF, this is not true for HFpEF patients, for who therapeutic options remain limited [12]. Novel diagnostic and prognostic tools as well as new therapies for HFpEF, based on a thorough understanding of the underlying mechanisms, are therefore urgently needed.

Thus fundamental research on the initial changes in the capillary endothelium of the heart and their relation to HFpEF is required in order to interrupt the underlying mechanism. The three biological compartments (inflammation, microvascular dysfunction and cardiac adaptation) are strongly influenced by other systemic, in particular metabolic, circulating factors. In CKD patients, interactions with other interrelated comorbidities such as diabetes and hypertension, as well as non-traditional renal specific mechanisms, may produce microvascular dysfunction.

Moreover, also in the chronically diseased kidney functional and structural changes in the capillaries are an early event probably occurring before the disease becomes symptomatic. However, whether the same factors play a role in the microvascular/endothelial disturbances in both organs is also not clear. Thus whether patients with metabolic CRS require a specific therapeutic approach that is fundamentally different from the treatment used in patients with either CKD or HF alone is still hotly debated.

Rationale for chosen experimental design: In a series of experiments in a rodent model developing metabolic CRS, we will study the molecular mechanisms governing the relation between endothelial dysfunction and CKD that leads to HFpEF and vice versa. Current animal models focus primarily on a single morbidity while metabolic CRS is a multimorbid disease. Therefore we will develop and characterize a **new multimorbidity rodent model** that better corresponds to the patient population. This model combines a genetic rat strain with predisposition to obesity, hypertension and diabetes with the provision of a high salt diet and exogenous mineralocorticoid hormone to exacerbate fluid retention. Initially we will titrate and optimize this model to develop reproducible outcomes representing either 'mild' or 'marked' CRS. *In vivo* we will longitudinally monitor both renal and cardiac function in these animals in a series

of intertwined experiments, focussing on the coronary vasculature (endothelium) and on different parameters of diastolic heart function measured by Doppler-Echocardiography, such as the E/A mitral flow velocity (E/A ratio) and the E/E' ratio for estimation of the left ventricular filling pressure.

After the characterization **Step 1**, we will test the effect of circulating factors associated with CKD on disease development and progression. These factors will be derived from known literature and patient experiments conducted in work packages 1 and 2 of the RECONNECT consortium. By adding (**Step 2**) and removing (**Step 3**) these factors we will be able to monitor aggravation or alleviation of metabolic CRS-derived symptoms. In the end, we will also test new drugs derived from the results of Step 2 and 3 (**Step 4**). This flow will allow us to functionally evaluate novel pharmacological and cell-based therapeutic strategies in relation to endothelial changes at different stages of the disease process.

1. Nagueh, et al. "Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography." *Journal of the American Society of Echocardiography* 22.2 (2009): 107-133.
2. Desai & Fang. Heart failure with preserved ejection fraction: hypertension, diabetes, obesity/sleep apnea, and hypertrophic and infiltrative cardiomyopathy. *Heart Fail. Clin.* 2008;4:87-97
3. Go et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2013;127:e6-e245
4. Owan et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:251-59
5. Lam et al. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart. Fail.* 2011;13:18-28.
6. Boonman-de Winter, et al. "Prognosis of screen-detected heart failure with reduced and preserved ejection fraction in patients with type 2 diabetes." *International journal of cardiology* 185 (2015): 162-164.
7. El-Atat et al. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. *J Am SocNephrol.* 2004;15:2816-27
8. Sharma & Kass. "Heart failure with preserved ejection fraction mechanisms, clinical features, and therapies." *Circulation research* 115.1 (2014): 79-96.
9. Damman & Testani. The kidney in heart failure: an update. *EurHeart J.* 2015;36:1437-44
10. Damman et al. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35:455-69
11. Braam et al. Cardiorenal syndrome—current understanding and future perspectives. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:48-55
12. Hatamizadeh et al. Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:99-111
13. Lekawanvijit et al. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. *Circ Res.* 2012;111:1470-83
14. Dickhout et al. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circ Res.* 2011;108:629-42

3.2 Purpose

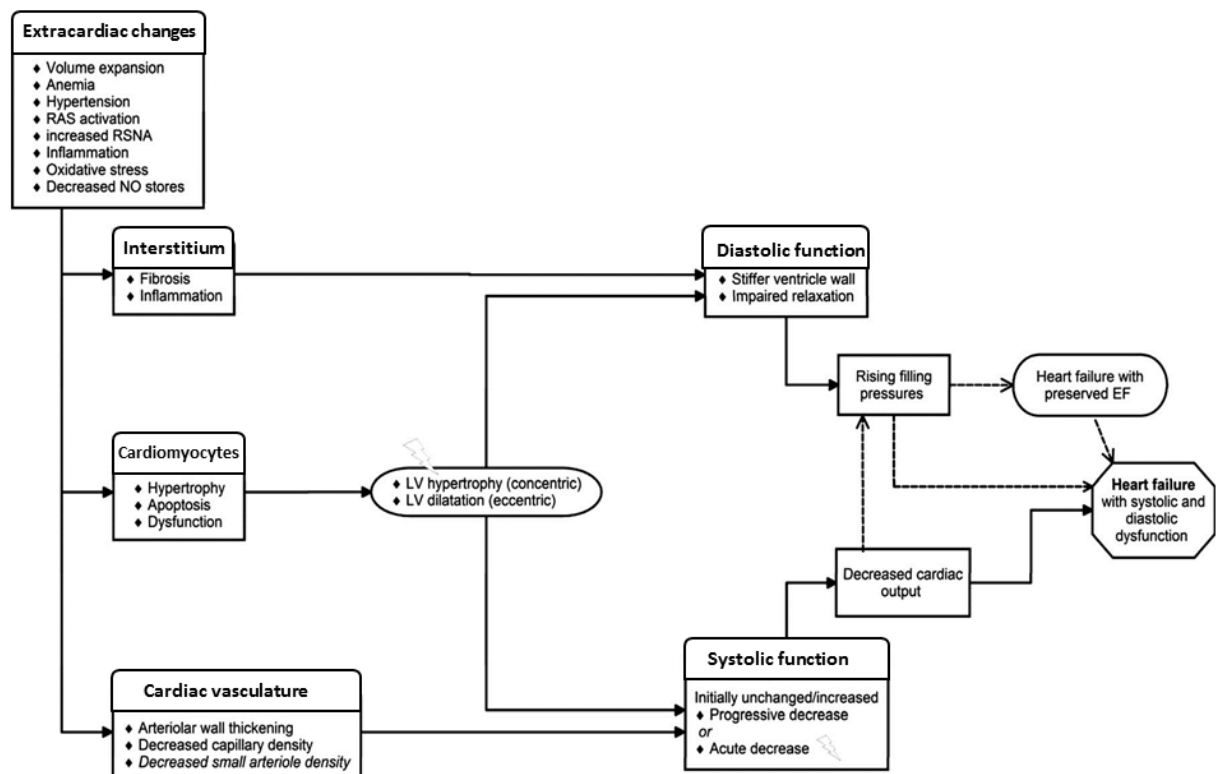
Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- 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?

We will test the hypothesis that CKD and its systemic consequences adversely impact the coronary microvasculature, modifying pathophysiology and vice versa that HF also impacts on the renal (glomerular and peritubular) microvasculature. Our **first aim** is to **morphologically and functionally define** microvascular dysfunction leading to HF with preserved ejection fraction (HFpEF) (figure 1), using an obese diabetic rodent model with or without increased dietary salt intake plus exogenous mineralocorticoid in order to study this process at different levels of severity (model development and characterization). Our **second aim** is to study the **molecular mechanisms** of these morphological and functional microvascular factors and evaluate the **effects**

of targeting such newly identified factors drug *in-vivo* in the mild and marked CRS models.

Aims of the proposed studies are highly achievable as they are or will form parts of large consortia. The first is RECONNECT, a consortium of 5 academic hospitals, funded by the Dutch Heart Foundation (NHS) (<http://www.reconnect-umc.eu/>). Lead partners are the department of Nephrology & Hypertension at the UMCU and the department of experimental cardiology at the



EUMC. Other partners include Experimental Cardiology at the UMCU and multiple other basic science and clinical partners at the UMCU, [REDACTED].

Figure 1. Cardiac consequences of renal failure. Loss of renal function causes activation and derangement of sympathetic, neurohormonal, metabolic, and hemodynamic pathways, leading to damage and dysfunction of the cardiac interstitial tissue, the cardiomyocytes, and the vasculature. Compensatory mechanisms like hypertrophy and dilatation initially maintain ejection fraction (EF) and cardiac output. With advancing damage, diastolic as well as systolic dysfunction may occur in the long term. An acute insult (flash), like myocardial infarction, results in aggravated damage and loss of function. This leads to worsening heart failure and decompensation. RAS, renin-angiotensin system; RSNA, renal sympathetic nerve activity; NO, nitric oxide; LV, left ventricular. Bongartz et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2012;303:F1253-63].

The position of the proposed studies in RECONNECT is as follows. Candidate pathogenic factors and “drugable” targets will be identified in large databases available to the consortium (Work package (WP) 1). Next these factors and targets will be extensively validated *in vitro* in cell and tissue culture experiments (WP2). However, such validation studies cannot assess the effects on whole organ kidney and heart function or systemic effects in the whole organism. Consequently, promising pathogenic (WP3) and therapeutic (WP4.1) candidates will be evaluated *in vivo* in the validated rodent models of mild and marked metabolic CRS outlined below (3.4.2). These models

will reveal complimentary candidates that will then be used to develop a strategy for clinical interventions (WP4.2), and a prognostic model (WP5). These steps are illustrated in figure 2. In all our projects clinical data and *in vitro* data will also be generated to help identify the targets for animal experiments and ultimately clinical trials. All in all, this strategy will lead to a reduction in the use of animals because the animal experiments are not a goal in themselves but are an essential translation tool from *in vitro* to the clinic. Future applications will be submitted to the Dutch Kidney Foundation (NSN), and the EU.

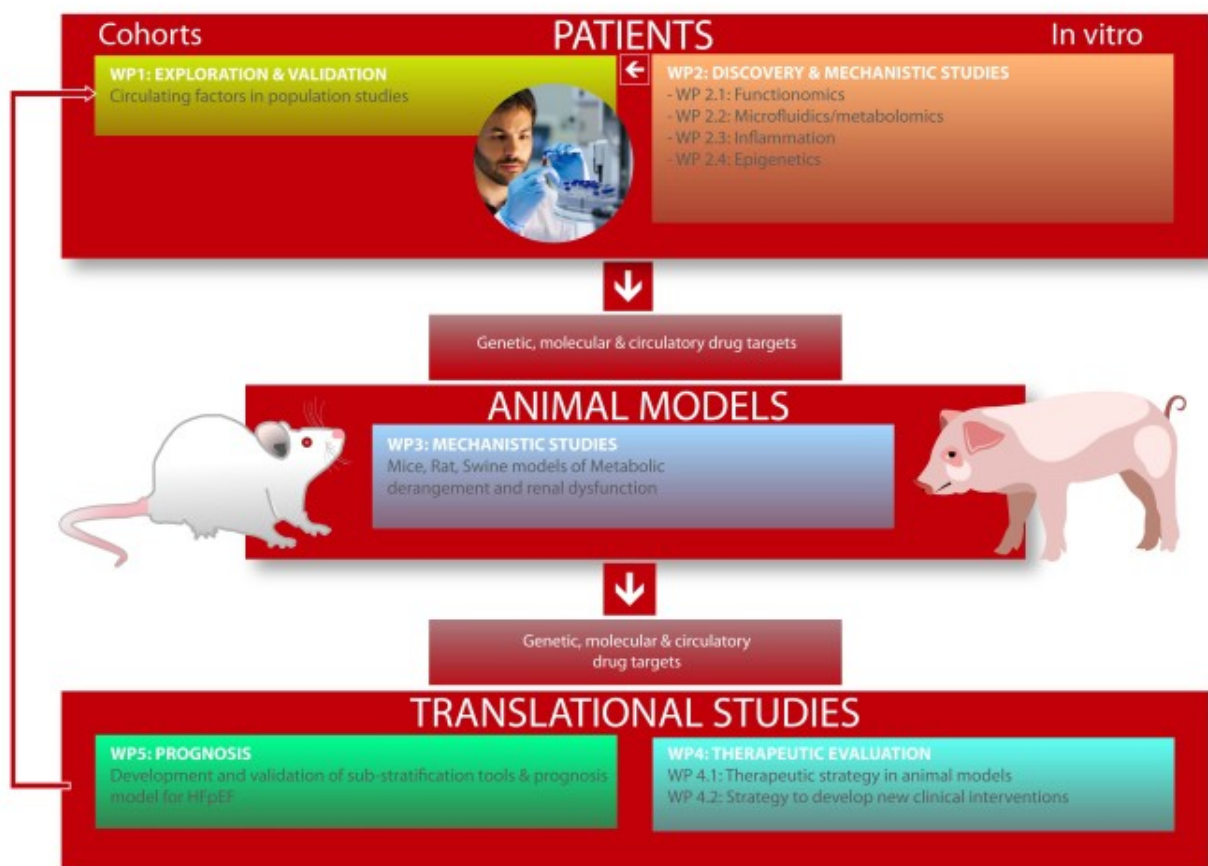


Figure 2. RECONNECT Workflow. The workflow of the RECONNECT consortium is composed of 3 main themes: patient studies, mechanistic animal studies and translational studies. The proposed research program and the composition of our consortium ensure robust connections and interactions between basic, translation, and clinical epidemiology research activities. **The large animal (porcine) model is being developed at the department of Experimental Cardiology at the EUMC and will not fall under this license.**

3.3 Relevance

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

Societal: The combination of chronic kidney disease (CKD) and HFpEF is associated with adverse prognosis. Although clinical studies hint at a specific bidirectional interaction between HFpEF and CKD, fundamental insight in the pathogenesis of the metabolic CRS remains limited [1, 2]. Partially due to a lack of animal models representing this patient population, specific treatment options for this severely threatened patient population addressing the causal processes are not available, and all we have is symptomatic relief.

Scientific: Recent insights indicate that microvascular disturbances within the target-organs play a central role in the relentless prognosis of both CKD [3] and HFpEF [4]. Furthermore, once CKD is established this leads to progressive microvascular dysfunction in the heart and elsewhere [5]. Conversely, HF also affects kidney microvascular structure and function. We hypothesize that several factors importantly contribute to microvascular dysfunction and progression of metabolic CRS.

Mechanistic: Metabolic CRS in our often obese and diabetic patients manifests itself first with CKD and diastolic HF; that is a stiffer heart with reduced diastolic filling but preserved EF (HFpEF). At rest these patients show some fluid retention and mild exercise intolerance. Such HF can progress to more severe edema and exercise intolerance and finally to reduced systolic output (HFrEF). This project will enhance our insight in the metabolic CRS, i.e. renal drivers of HFpEF, as well as the effects of HFpEF on CKD, allowing new personalized therapeutic solutions for patients with the metabolic CRS. With our studies we aim to generate data on pathogenic relations between CKD and HFpEF, focusing on endothelial changes in the capillaries in the phase of the disease that the EF is preserved (see sections 3.1 and 3.2 for rationale and aims of the project respectively). We aim to find new prognostic markers for early disease detection and the identification of putative drug targets for future therapy development. Our current proposal will allow us to accurately and effectively investigate known and yet-to-be-identified circulating factors associated with CKD and HFpEF. By testing their potential to aggravate (by addition) or alleviate (by removal) disease development and progression, we may be able to select potential new drug candidates.

1. Bongartz et al. Target organ cross talk in cardiorenal syndrome: animal models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303:F1253-63.
2. Whaley-Connell et al. Pathophysiology: the cardiorenal metabolic syndrome. *J Am SocHypertens*. 2014;8:604-6.
3. van Koppen et al. Healthy bone marrow cells reduce progression of kidney failure better than CKD bone marrow cells in rats with established chronic kidney disease. *Cell Transplant*. 2012;21:2299-312
4. Paulus & Tschöpe. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodelling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am CollCardiol*. 2013;62:263-71.
5. Bongartz et al. Subtotal nephrectomy plus coronary ligation leads to more pronounced damage in both organs than either nephrectomy or coronary ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H845-54.

3.4 Research strategy

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

CRS patients commonly present with multiple co-morbidities, whereas animal models usually focus on a single co-morbidity. We will utilize the obese diabetic Zucker fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1) rat, an obese rodent model that combines obesity, hypertension, diabetes to assess their contribution as well as their interaction in the development and progression of metabolic CRS. Initially this model develops renal disease, and subsequently HFpEF [1, 2].

The Steps described below have been designed to support causality for an identified factor and the phenotype using Koch's classic postulates demonstrating association, temporal relation, induction and reversal.

Step 1: This obese rodent model **and its lean counterpart** will be subjected to a pharmacological and dietary model that leads to fluid retention and hypertension, namely desoxycorticosterone

acetate (DOCA) plus dietary salt. Fluid retention and hypertension are key elements of metabolic CRS and therefore an essential part of the model. DOCA plus dietary salt is known to induce mild diastolic heart failure (HFpEF) in laboratory rats [3]. This approach implies that in step 1 we will fully characterize obese ZSF1 and lean ZSF1 control rats without and with DOCA+salt. Important aspects of this definition are morbidity and mortality prior to the addition of DOCA+salt (see section 3.4.2) and at the end of follow-up. Step 1 will be performed in parallel in male and female rats.

Steps 2 and 3: From these four groups we will select two groups, one obese mild and an obese marked CRS model, to study known (neurohumoral & inflammatory factors, uremic toxins, oxidative stress) and novel CKD-and HFpEF-associated circulating factors (derived from biobanks of multiple well-defined patient cohorts in WP1 and WP2, see 3.2) and their causal roles in coronary and renal microvascular dysfunction and pathogenesis of CKD and HFpEF. By adding these factors in the model with mild symptoms (**Step 2**) and removing or blocking these factors in the model with marked symptoms (**Step 3**) we will be able to monitor aggravation or alleviation of metabolic CRS-derived symptoms.

[REDACTED] . A **no-go** criterium is the development of persistent HFrEF ([REDACTED]), shallow breathing and/or severe weight loss (more than 15% of the body weight at 3 months of age, which is a lot for an obese rat). Note, during the development and progression of CRS edema formation (primarily ascites) may occur, which will cause a small weight gain. Body weight will therefore be closely monitored during the experiment, taking this into account.

Monitoring: Renal and systemic hemodynamic parameters will be regularly monitored in addition to echocardiographic evaluation to obtain a clear view of cardiac and renal functional changes over time. Besides mechanistic studies, we will regularly sample urine and blood from our animals and relate these to terminal tissue samples in order to evaluate circulating culprits linked to pathogenic pathways.

Step 4: Finally, we will target these validated factors with conventional and novel drugs in the selected group of ZSF1 rats, i.e. in obese rats with marked metabolic CRS.

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.

An outline of the different components of this project:

Step 1: Model characterization and optimization.

We will characterize structural and functional changes in the heart and kidney with a focus on the microvasculature in a genetic rat model (obese ZSF1 rat) combined with a pharmacological plus dietary model (DOCA + dietary salt). The objective is to achieve a 'mild' and a 'marked' model of chronic kidney disease (CKD) and heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) in the obese ZSF1 rat. A longitudinal protocol is designed to track cardiac left intraventricular pressure, cardiac function and dimensions (by echocardiography, tail-cuff plethysmography) and renal function (blood and urine samples) regularly in obese and lean control ZSF1 rats. A subgroup will be implanted with a telemetry device in order to measure left ventricular diastolic pressure in

freely moving rats. Some of these rats will also be treated with DOCA + dietary salt to retain fluid. [REDACTED] DOCA (via subcutaneous pellet) and dietary salt will be administered [REDACTED]. A **no-go** is more than 10% mortality prior to start of DOCA + dietary salt.

Step 2: Studying effects of adding known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in mild metabolic CRS

We will test the most promising pathogenic targets previously validated in the patient databases and in *in vitro* analyses of the workpackages 1 and 2 from the RECONNECT study (see 3.2 figure 2) in our stable 'mild' and 'marked' CRS rodent models obtained from Step 1. These factors are not yet known, but will be provided by work packages 1 and 2 during the course of the project. Examples of factors which might be involved in progression of CRS are vasoconstrictors, inflammatory factors, growth factors (such as FGF23), matrix forming proteins or uremic toxins. We will assess whether administration of these identified factors will aggravate the disease progression in the mild CRS model. The marked CRS model will serve here as positive control. The administration of these factors will start at defined levels of renal and cardiac injury derived from the first step. Longitudinal measurements will be performed to determine cardiac function and dimensions and renal function and in a subgroup a telemeter will be implanted to measure left ventricular diastolic pressure 24/7.

The route of administration depends on the factors itself, if it concerns a peptide a subcutaneously implanted osmotic pump will be used while when a lipophilic factor is involved it will be given orally. The same applies for the dosage and frequency at which the factors will be administered in the animals. A **no-go** criterium is persistent HFrEF ([REDACTED]), shallow breathing and/or weight loss (more than 15% of the body weight at 3 months of age).

Step 3: Studying effects removing known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in marked metabolic CRS

Subsequently, we will remove or block the identified circulating factors provided from the work packages 1 and 2 in our stable marked CRS model and observe if we can alleviate the disease progression towards a milder phenotype. The mild CRS model will serve in this step as reference for the mild phenotype. Again longitudinal measurements will be performed to determine cardiac function and dimensions and renal function and in subgroups a telemeter will be implanted to measure left ventricular diastolic pressure 24/7.

Step 4: Drug testing phase

We will assess whether intervention with target-specific drugs based on the results of Step 2 and 3 will limit renal and coronary overall and microvascular dysfunction. Drug efficacy studies in our marked CRS model will provide evidence for the suitability of these interventions for targeted therapy for specific co-morbidity subgroups of CKD-HFrEF patients. These interventions will also start at defined levels of renal and cardiac injury derived from Step 1. A **no-go** criterium is persistent HFrEF ([REDACTED]), shallow breathing and/or weight loss (15% of the body weight at 3 months of age).

Training of the different techniques is also required to minimize mortality in the animals due to technical failures. Therefore techniques such as blood sampling, echocardiography, imaging of the microvasculature, tail-cuff plethysmography, implantation of telemetric catheters into the left

ventricle for measuring left intraventricular diastolic pressure and the terminal experiment to assess renal function will be practised in both lean as well as obese animals. Due to differences in body composition, surgical interventions in lean (males +/- 500g) and obese (males +/- 800g) may require different techniques.

1. Hamdani et al. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 2013;6:1239-49.
2. Bilan et al. Diabetic nephropathy and long-term treatment effects of rosiglitazone and enalapril in obese ZSF1 rats. *J Endocrinol* 2011;210:293-308.
3. Ogata et al. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats is ameliorated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate, partly by suppressing inflammatory responses associated with the nuclear factor-kappa-B pathway. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1481-8.

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.

Step 1: characterisation of functional and structural endothelial changes at different stages of the disease process. To this end, we will develop two models one representing mild CRS and one marked CRS. This is the first milestone.

Step 2 and 3: validation of **pathogenic factors** in the models characterised in Step 1 representing mild and marked CRS **inducing** functional and structural endothelial changes at different stages of the disease process. To this end we will both **administer (Step 2)** and **block or remove (Step 3)** these factors. This is the second milestone.

Step 4: characterisation of **druggable therapeutic factors** in a well-defined model representing marked CRS **ameliorating** functional and structural endothelial changes at this stage of the disease process. These (probably novel) drugs will be selected based on the results of steps 2 and 3. This is the third and last milestone. **The four steps are consecutive.**

Our ultimate goal is to translate the mechanistic insight in metabolic CRS in relation to endothelial changes at different stages of the disease process, generated by step 1-3, into prognostic and therapeutic interventions.

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	Cardiac and renal function and structure in the obese ZSF1 rat
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2	Provide the name of the licensed establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	<i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	1	Cardiac and renal function and structure in the obese ZSF-1 rat

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.

The ultimate aim of this project is to translate the mechanistic insight in cardiorenal syndrome, generated by several consecutive steps, into therapeutic (pharmacological and cell-based) interventions (see outline 3.4.2.). We will test the hypothesis that impaired kidney function and its systemic consequences adversely impact the coronary microvasculature, modifying pathophysiology and vice versa that HF also affects the renal microvasculature. Our strategies will help to elucidate the mechanistic pathways involved in the pathogenic cross-talk between renal drivers, systemic inflammation, microvasculature, and renal and cardiac parenchymal cells leading to progressive CKD, HF (HFpEF), and combined models of CKD plus HFpEF. The individual steps are connected as follows:

Step 1: Model characterization and optimization.

We want to characterize the obese Zucker fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1) rats with and without added (desoxycorticosterone acetate) DOCA plus dietary salt compared to the lean ZSF1 controls. Fluid retention and hypertension are key elements of metabolic cardiorenal syndrome (CRS) and therefore an essential part of the model. DOCA plus dietary salt is known to induce mild diastolic heart failure (HFpEF) in laboratory rats [3]. Initially the obese ZSF1 model develops renal disease, and subsequently HFpEF [1, 2]. In **Step 1**, we will fully characterize 4 experimental groups with the ultimate goal to titrate experimental settings to such an extent that reproducible and representative models of 1) stable mild metabolic CRS (mild HFpEF) and 2) stable marked metabolic CRS (marked HFpEF) in the obese ZSF1 rat can be obtained.

Characterizing and optimizing our model is necessary since no representative animal models exist with CKD-induced HFpEF that reflects the multimorbid state of HFpEF patients. As mentioned, most animal models focus on a single morbidity, which does not fully represent the clinical manifestations of the patient. By optimizing a multimorbid model, we will 1) be able to mimic patient pathology more accurately, and 2) introduce a new model to the cardiovascular scientific field that may have broader but more accurate applications than the currently available rodent models.

[4, 5]. This will mean that the experimental concentrations of DOCA and dietary salt may need to be adjusted to obtain the desired output parameters (). Initially, DOCA will be time-released by a subcutaneously implanted pellet plus dietary salt will be mixed into the ground chow (6% w/w).

Primary outcome parameters for model characterization and optimization will be tracked longitudinally and consist of measuring the intraventricular pressure, cardiac function and dimensions and the renal function. Functional heart measurements will thus provide us with information about the impact disease development and progression has on cardiac output and specifically on the coronary microvasculature. After a terminal renal function experiment, *ex vivo* analysis will be performed to assess organ and tissue damage (e.g. heart, kidney and (coronary) vasculature using qPCR, Western Blot and immunohistochemistry) among others.

In parallel to **Step 1**, *in vitro* experiments will be performed on patient samples. Pilot data have confirmed that circulating factors associated with CKD induce a microvascular response. Future results will be linked to and incorporated in the set-up of the animal experiments while reciprocally *in vitro* experiments may be performed on animal samples (e.g. organ-derived cells, blood) to further optimize the model.

Step 2: Studying effects of adding known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in mild metabolic CRS

The work packages 1 and 2 of the RECONNECT study (see workflow 3.2.) will identify factors associated with CKD and HFpEF from the patient samples, which can serve as novel drug targets for the treatment of HFpEF. At the moment these factors are still unknown, however examples of these factors could be vasoconstrictors, inflammatory factors, growth factors , matrix formation proteins or uremic toxins. The factors provided from work packages 1 and 2 will subsequently be implemented in our study to assess their efficacy in our animal models in a proof-of-mechanism study by first **adding** these identified factors in the stable mild CRS model and looking at aggravation of the primary outcome parameters (longitudinally measuring the intraventricular pressure, cardiac function and dimensions and renal function, in addition to *ex vivo* analyses). The mild model will be used to see if administering these factors will lead to a more severe phenotype similar to the marked CRS model. The marked CRS model is required in this step as the positive control. Specifically we want to assess whether administration of known and newly identified CKD-associated circulating factors aggravates renal and coronary overall and microvascular dysfunction at various stages of metabolic CRS. Depending on the progression and characterization of the stable mild model obtained in Step 1 we will determine the specific time point at which these factors will be administered. The route of administration relies on the nature of the factors, in the case of a peptide a subcutaneously implanted osmotic pump will be used while when a lipophilic factor is involved it will be given orally. Naturally, the dosage and frequency at which the factors will be administered in the animals is dependent on the properties of each factor.

Step 3: Studying effects of removing known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in marked metabolic CRS

Subsequently, we will **remove** the identified factors in the stable marked CRS model and monitor improvement of the primary outcome parameters in an identical set-up. The marked model will be used in this step to see if removing these factors alleviates its phenotype to the situation of the mild CRS model. The mild CRS model serves here as the reference value for the mild phenotype. In this part of the project, we will assess whether intervention of newly identified CRS-associated drug targets will limit renal and coronary

overall and microvascular dysfunction as well as onset and progression of HFpEF at various stages of CRS.

Step 4: Drug testing phase

Subsequent drug efficacy studies in the animal model with marked metabolic CRS background will provide evidence for the suitability of these interventions for targeted therapy for specific co-morbidity subgroups of CKD-HFpEF patients.

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

Step 1 will deal with model characterization and optimization.

By using obese diabetic Zucker fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1) rats with and without added (desoxycorticosterone acetate) DOCA and dietary salt in parallel with the lean ZSF1 controls, we will generate 4 main experimental groups.

- 1) Lean ZSF1
- 2) Lean ZSF1 + DOCA/dietary salt
- 3) Obese ZSF1
- 4) Obese ZSF1 + DOCA/dietary salt

Note that DOCA (administered by implanted s.c. pellet) is always combined with dietary salt. If necessary the model can be alleviated by reducing the dosage of DOCA, dietary salt or both. In this model we will titrate DOCA and dietary salt in obese ZSF1 rats until we reach the threshold of HFpEF, [REDACTED]. From this point on, the dosage of DOCA and dietary salt have to be lowered in order to obtain both a mild and a marked metabolic CRS model in obese ZSF1. Step 1 will be performed in parallel in male and female rats. Currently very little information is available on the phenotype of female lean and obese ZSF1 rats.

Primary outcome parameters for model characterization and optimization will be tracked longitudinally [REDACTED], starting in the adult life phase of the animal. [REDACTED]. This allows us to accurately follow the development and progression of the metabolic CRS with non-invasive or low-invasive measurements. We will monitor intraventricular pressure, cardiac function and dimensions in rest and the renal function. Longitudinal (non-invasive and low-invasive) measurements consists of echocardiography, collecting urine in metabolic cages for a maximum of 24 hours, determining systolic blood pressure by tail-cuff plethysmography, imaging the coronary microvascular bed, determining left ventricular pressure in subgroups of freely moving rats by telemetry (implanted left ventricular catheter with transmitter in the abdomen) and drawing blood. In a terminal experiment, renal function will be determined with gold-standard clearance methodology.

Microvasculature can be imaged by a multitude of techniques, including Doppler flow Imaging, microCT (Skyscan, VEVO) and MRI. In consultation with experts in the field, our collaborative partners and the IVD, we will determine which technique is the most feasible in the current project (e.g. invasiveness in repeated measures, quality of the measurements, availability).

Dietary salt will be provided by mixing through ground standard rodent chow, possibly in different concentrations, but with a starting concentration of 6%. DOCA will be provided through a subcutaneously implanted timed-release pellet (Innovation Research of America, pellets [REDACTED]). Placebo pellets will be subcutaneously implanted in the groups without DOCA and dietary salt. Consulting previous literature and talking to experts in the field will determine definite DOCA and salt concentrations.

Step 1 will generate two experimental animal models; mild versus marked metabolic CRS in the obese ZSF1 rat, which have been optimized to generate reproducible results on multi-morbidity. Lean ZSF1 rats will function as controls.

In **Steps 2, 3 and 4** longitudinal measurements and their frequency will be similar to **Step 1**. The focus will

however be on aggravating or alleviating renal and coronary overall and microvascular dysfunction and onset and progression of HFpEF at various stages of CRS. Note that, because of unavoidable factors such as genetic drift in the breeders' colony as well as experience of the experimental crew, the untreated models will need to be included for each subsequent experiment.

All *in vivo* experiments will be followed by *ex vivo* and *in vitro* analyses. *Ex vivo* read-outs include:

- 1) vasoactive responses in isolated coronary arterioles, 2) cardiac/renal (immuno)histology,
- 3) gene/protein expression, 4) plasma and cells available for mechanistic studies in other work packages.

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

To avoid experimental variation, all main experimental groups in all Steps will be studied longitudinally in balanced cohorts. Before the start of an experiment, 'go/no go' moments of previous steps will be analysed, and if possible and available, additional results from *in vitro* and *ex vivo* experiments will be implemented to optimize experimental designs. Typical 'go/no go' decisions are based on humane endpoints (see below), achieving stable models of mild and marked metabolic CRS (Step 1), and identifying consistent responses of induction and reversal of typical CRS symptoms and post-mortem changes after addition or removal/blockade of identified factors (Steps 2 and 3 respectively).

In this current project there are multiple primary readout parameters, measured either longitudinally or obtained from a terminal experiment. After consultation with the cardiologist we have chosen for **the Doppler E/E'** (ratio of early mitral inflow velocity and early diastolic velocity of the mitral annulus) as the most important output parameter for the evaluation of diastolic function. The E/E' is of great importance for the prediction of the left ventricular filling pressure. Elevated filling pressures are main physiologic consequences of diastolic dysfunction [6].

For the subgroups of animals that will be implanted with the telemetry device, the primary readout parameter will be the left ventricular end diastolic pressure.

Note, the above-mentioned increases for the two primary parameters are specifically for comparison of the mild and the marked CRS models, these differences are not applicable between the healthy and the mild model.

While we focus on the coronary microvasculature in relation to the progression of CKD and HFpEF, we will use the distinctive models 'mild HFpEF' and 'marked HFpEF' since it is believed that even mild renal impairment causes metabolic and systemic derangements in circulating factors that introduce an activated systemic inflammatory state and microvascular dysfunction, which may be aggravated in models of severe HFpEF. We will use adult animals because the model, both 'mild' and 'marked' CRS will take time to develop [7].

We do expect to reach humane endpoints (HEPs) due to model-related complications e.g. shortness of breath combined with renal failure in a chronic experimental setting, see also **Humane Endpoints**.

However, we do not expect interim-mortality since longitudinal measurements may help us to prematurely take animals out of the study that are expected to experience an increased distress. Cumulatively, we expect to reach HEPs in 10% of the animals with mild CRS, thus 90% survival, with HEPs primarily due to technical problems related to anesthesia required for longitudinal measurements and telemetry implantation and in 25% of the animals with a maximum of marked CRS, thus 75% survival, primarily due to the same technical problems, but also shallow breathing or severe weight loss (more than 15% of body weight at 3 months of age). Note, during the development and progression of CRS edema formation (primarily ascites) may occur, which will cause a small weight gain. Body weight will therefore be closely monitored during the experiment, taking this into account.

In **Step 1a**, we will look at a maximum of 8 experimental groups.

- 1) Lean ZSF1
- 2) Lean ZSF1 + DOCA and dietary salt 6%
- 3) Lean ZSF1 + DOCA and dietary salt % unknown

- 4) Lean ZSF1 + DOCA and dietary salt% unknown.2
- 5) Obese ZSF1
- 6) Obese ZSF1 + DOCA and dietary salt 6%
- 7) Obese ZSF1 + DOCA and dietary salt % unknown
- 8) Obese ZSF1 + DOCA and dietary salt % unknown.2

With an effect size (f) = 0.25, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 8 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors. **The outcome was N = 96**, specific for the readout parameter E/E', meaning we would like to conduct this experiment with **N = 12 animals per experimental group**, which should have significantly different clinical manifestations in the disease spectrum. We believe that the calculated outcome predicts a sufficient amount of animals needed to see differences between the groups, even with variation in disease progression due to differences in genetic background.

In Step 1a we will look at the characterization and progression of CRS in both male as well as female ZSF1 rats, because not much is known about the CRS phenotype in the female animals compared to the male rats. Depending on the outcomes of this step, we will decide whether we proceed with the male or female animals for the following steps. A crucial aspect in this decision is that we need to acquire both the stable 'mild' and the 'marked' CRS model in these animals in the chosen time-frame in order to be able to answer our research question. Therefore the number of animals in Step 1a will be **duplicated** to include both male and female ZSF1 rats.

In **Step 1b**, we will further characterize the 2 main experimental groups derived from **Step 1a** and the control groups **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 1a will serve as input for Step 1b.

- 1) Mild CRS in obese ZSF1 rats
- 2) Marked CRS in obese ZSF1 rats
- 3) Healthy lean ZSF1 rats
- 4) Lean ZSF1 rats with mild conditions

Note that it is impractical and too expensive to instrument all 8 groups described in 1a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the number of measurements is set to 20.

With an effect size (f) = 0.50, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

The outcome was N = 20 specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

In **Step 2a**, we will **administer** known and novel CKD-associated circulating factors in a mild model of metabolic CRS. In Step 2, we would like to investigate whether or not these factors can **aggravate** disease progression. The marked CRS model will serve as a positive control. We will test a maximum of 8 factors with 2 factors per cohort. Therefore, we will generate a total of **16 experimental groups**.

- 1) Mild CRS
- 2) Mild CRS + circulating factor1
- 3) Mild CRS + circulating factor2
- 4) Marked CRS

Again, we will use the E/E' as our primary readout parameter.

With an effect size (f) = 0.25, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 16 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

The outcome was N = 128, specific for the readout parameter E/E', meaning we will have **N = 8 animals per experimental group**.

In **Step 2b**, we will further investigate **administration of** the 2 most promising circulating factors derived from **Step 2a**, the untreated group and the positive control **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 2a will serve as input for Step 2b.

- 1) Mild CRS
- 2) Mild CRS + factor 1
- 3) Mild CRS + factor 2
- 4) Marked CRS

Note that it is impractical and too expensive to instrument all 16 groups described in 2a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the amount of measurements is set to 20.

With an effect size (f) = 0.50, Power = 0.9 and α = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

The outcome was N = 20 specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

In **Step 3a**, we will **remove** known and novel CKD-associated circulating factors in a marked model of metabolic CRS. In Step 3, we would like to investigate whether or not these factors can **alleviate** disease progression. The mild CRS model will serve here as the reference value for the mild phenotype. We will test a maximum of 8 factors with 2 factors per cohort. Therefore, we will generate a total of **16 experimental groups**.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + circulating factor1
- 3) Marked CRS + circulating factor2
- 4) Mild CRS

Again, we will use the E/E' as our primary readout parameter.

With an effect size (f) = 0.25, Power = 0.9 and α = 0.05, number of measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 16 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

The outcome was N = 128, specific for the readout parameter E/E', meaning we would like to conduct this experiment with **N = 8 animals per experimental group**.

In **Step 3b**, we will further characterize **removal of** the 2 most promising circulating factors derived from **Step 3a** and the untreated group and our mild control (reference value) **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 3a will serve as input for Step 3b.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + factor1
- 3) Marked CRS + factor2
- 4) Mild CRS

Note that it is impractical and too expensive to instrument all 16 groups described in 3a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the amount of measurements is set to 20.

With an effect size (f) = 0.50, Power = 0.9 and α = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

The outcome was N = 20 specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

In **Step 4a: Drug testing phase** we will drug target factors identified and characterized in steps 2 and 3. We will test a maximum of 8 drugs with 2 factors per cohort; however we will need to repeatedly include our

controls and our mild CRS control as a reference value because of unavoidable factors such as genetic drift in the breeder's colony as well as experience of the experimental crew. Therefore, we will generate a total of **16 experimental groups**.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + candidate drug 1
- 3) Marked CRS + candidate drug 2
- 4) Mild CRS

Again, we will use the E/E' as our primary readout parameter.

With an effect size (f) = 0.25, Power = 0.9 and α = 0.05, number of measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 16 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

The outcome was N = 128, specific for the readout parameter E/E', meaning we would like to conduct this experiment with **N = 8 animals per experimental group**.

In **Step 4b**, we will further characterize **efficacy** of the 2 most promising candidate drugs derived from **Step 4a** and the untreated group and the mild CRS (reference value) **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 4a will serve as input for Step 4b.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + drug 1
- 3) Marked CRS + drug 2
- 4) Mild CRS

Note that it is impractical and too expensive to instrument all 16 groups described in 4a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the amount of measurements is set to 20.

With an effect size (f) = 0.50, Power = 0.9 and α = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors

The outcome was N = 20 specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

To minimize mortality in the sense of technical failure, training will be necessary to master implantation of telemeters (left ventricle), echocardiography, a yet to be determined microvasculature visualization technique, a terminal renal experiment. Due to differences in body composition, surgical interventions in lean (males +/- 500g) versus obese (males +/- 800g) ZSF1 rats, may require different techniques. We believe that, at all times, 1 technician and 1 PhD student should have mastered these skills, since 24h measurements collected by telemetry are part of our refinement strategy, as previously discussed in this protocol. A total of 3 persons (1 additional art. 12 or PhD student next to the previously stated 2 employees) will require training and education for this project. Due to the complexity of the surgery, an external training course in telemetry implantation at the René Remie Surgical Skills Centre will be followed to ensure that the needed skills are obtained. The knowledge of this course will be transferred to the involved persons in this project to expand the obtained knowledge at the department and the animal facility. In this way the surgeries can be performed by our own skilled staff during the whole course of this project so the quality of implantation can be guaranteed. This dispels the need to order already instrumented rats from external sources.

A difference between invasive and non-invasive methods will be made for the training. Invasive methods include blood sampling via puncture of the tail vein, telemetry implantation in the left ventricle, and the terminal experiment. Non-invasive methods include echocardiography, microvasculature imaging and tail-cuff plethysmography. To minimize the number of animals for training we choose to let the animals used for non-invasive methods to recover from the light inhalation-anesthesia so that they can be re-used.

Based on previous calculations and experience in how long training will take on average, we predict that we will need N = 150 animals (i.e. N = 50/person). The animals will be divided as followed, with the number of animals stated per type:

- N = 15 for blood sampling via tail vein and terminal experiment (combined practice)
- N = 25 for telemetry implantation into the left ventricle
- N = 5 for echocardiography, microvasculature imaging and tail-cuff plethysmography (combined practice of echocardiography and microvasculature imaging and re-use of animals)
- **Note:** in case the use of a subcutaneously implanted osmotic pump is required for administering of the circulating factors in Step 2 N = 5 animals will be used for training. If this technique is not required, training will not be necessary.

It will moreover be necessary to choose an optimal technique to measure the *in vivo* structure and function of the microvasculature. Due to differences in body composition, the preferred technique should function in both lean (males +/- 500g) and obese (males +/- 800g) ZSF1 rats. If possible and present, surplus animals will be used for training purposes and testing will be combined with training from [REDACTED] or telemetry implantation, allowing multiple techniques to be trained on a single animal.

1. Damman & Testani. The kidney in heart failure: an update. *Eur Heart J.* 2015;36:1437-44
2. Damman et al. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35:455-69
3. Braam, et al. Cardiorenal syndrome—current understanding and future perspectives. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:48-55
4. Bongartz, et al. "Subtotal nephrectomy plus coronary ligation leads to more pronounced damage in both organs than either nephrectomy or coronary ligation." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302.3 (2012): H845-H854
5. van Koppen, et al. "5/6th nephrectomy in combination with high salt diet and nitric oxide synthase inhibition to induce chronic kidney disease in the Lewis rat." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 77 (2013): e50398-e50398.
6. Nagueh, et al. "Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography." *Journal of the American Society of Echocardiography* 22 (2009): 107-133.
7. Hamdani et al. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 2013;6:1239-49
8. Babelova et al. Sex-differences in renal expression of selected transporters and transcription factors in lean and obese Zucker spontaneously hypertensive fatty rats. *J Diabetes Res.* 2015;2015:483238

B. The animals

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

To minimize the variation in our primary readout-parameter E/E' and to approximate the adult heterogenic multimorbidity patient population with metabolic CRS as much as possible, the ZSF1 model + additional intervention (DOCA and dietary salt) is preferred. The ZSF1-Lepr^{fa}Lepr^{cp}/CrI rat is an outbred model and is bred by Charles River in Sulzfeld (G). We chose an outbred model due to the presence of genetic variability, representative of the human population. We will use adult animals [REDACTED] because the model, both 'mild' and 'marked' CRS, will take time to develop. [REDACTED]

Obese ZSF1 rats are known to exhibit only mild CRS at 20 weeks of age [7]. Addition of DOCA and dietary salt will allow us to tune this disease development and progression carefully. Currently, there is very little characterization present of the phenotype found in female ZSF1 rats. There is no information on cardiac function in female ZSF1 rats, but their renal injury appears to be milder than in males [8]. This is a common finding in laboratory rats. Therefore in Step 1A of this project we will start by using both male as well as female ZSF1 rats for the characterization and progression of CRS. Depending on the outcomes of the models in this step we will decide whether we proceed with male or female rats for the subsequent steps. An important aspect in this matter is that we need to acquire both the stable 'mild' and the 'marked' CRS model [REDACTED] in order to address our research question.

Total N = 150 animals for training and education for 3 persons. If possible and available, surplus animals or animals from other protocols are used for training purposes.

For **Step 1a**, we need a terminal group size of N = 12 with 8 experimental groups. We have previously estimated that survival of 'mild' CRS animals will be minimally 90% while survival of 'marked' CRS animals

will be 75% minimally. While **Step 1a** is a model characterization step, we estimate that all groups on average will have a survival of at least 80%. Note that the inclusion of both male and female ZSF1 rats duplicates the number of animals required in this step.

Total N including mortality: N = 120 female and 120 male lean ZSF1, N = 120 female and 120 male obese ZSF1

The outcome of Step 1a will determine whether we proceed with male or female rats in Step 1b and all subsequent steps.

For **Step 1b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups

Total N = 5 lean healthy ZSF1, 5 lean ZSF1 with conditions for mild CRS, 5 obese ZSF1 with conditions for mild CRS, 5 obese ZSF1 with conditions for marked CRS. We expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS. Due to the implantation of the telemetry device we expect a mortality of approximately 30% in the beginning due to inexperience. Therefore we expect a maximum survival of 60% in marked CRS and a 70% survival in mild CRS and lean ZSF1 rats.

Total N including mortality: N = 8 healthy lean ZSF1, N = 8 lean ZSF1 with conditions for mild CRS, N = 8 obese ZSF1 with conditions for mild CRS, N = 9 obese ZSF1 with conditions for marked CRS

For **Step 2a**, we need a terminal group size of N = 8 with 16 experimental groups to investigate whether or not **administration** of known and novel CKD-associated circulating factors may **aggravate** disease progression. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

With 4 (4 cohorts of 4 experimental groups, total of 16) x N = 8 per mild or marked group, we will obtain

Total N = 96 mild CRS rats, N = 32 marked CRS rats

Total N including mortality: N = 108 mild CRS, N = 44 marked CRS

For **Step 2b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups.

Total N = 15 mild CRS, N = 5 marked CRS. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

Total N including: N = 18 mild CRS, N = 7 marked CRS

For **Step 3a**, we need a terminal group size of N = 8 with 16 experimental groups to investigate whether or not **removal** of known and novel CKD-associated circulating factors may **alleviate** disease progression. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

With 4 (4 cohorts of 4 experimental groups, total of 16) x N = 8 per mild or marked group, we will obtain

Total N = 32 mild CRS rats, N = 96 marked CRS rats

Total N including mortality: N = 36 mild CRS, N = 132 marked CRS

For **Step 3b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups.

Total N = 5 mild CRS, N = 15 marked CRS. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

Total N including: N = 6 mild CRS, N = 21 marked CRS

For **Step 4a**, we need a terminal group size of N = 8 with 16 experimental groups to investigate whether or not **new drugs** of known and novel CKD-associated circulating factors may **alleviate** disease progression. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

With 4 (4 cohorts of 4 experimental groups, total of 16) x N = 8 per mild or marked group, we will obtain

Total N = 32 mild CRS rats, N = 96 marked CRS rats

Total N including mortality: N = 36 mild CRS, N = 132 marked CRS

For **Step 4b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups.

Total N = 5 mild CRS, 15 marked CRS. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

Total N including: N = 6 mild CRS, N = 21 marked CRS

Therefore, for all studies described in Appendix 1 we estimate that we will need a total maximum of:

N = 150 for training

N = 256 lean ZSF1 rats

N = 824 obese ZSF1 rats

A total of N = 1230 rats

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.

Unfortunately, *in vitro* data alone will not give sufficient insight into the process disease development and progression, due to the interplay of multiple organs and unknown mechanisms. Thorough searches of the literature have confirmed that experiments have not been previously conducted and our model to be developed is unique in its kind.

Replacement: Within the project, *in vitro* analyses will also be performed. Not only will we investigate cells and samples (e.g. blood) derived from the animal experiments, but patient samples will also be used. The project will have access to well-characterized HFpEF patient cohorts, enabling direct translation from bench to bedside. Immortalized cells, specifically, vascular (endothelial and smooth muscle) cells will be cultured and exposed to blood or blood constituents of defined patients and healthy controls. The rationale for performing this study *in vivo* is based on the fact that there are currently no *in vivo* models available that mimic multimorbidities that can be translated to the patient. *In vitro* experiments will take place in parallel to the animal studies. Moreover, results generated from the *in vivo* studies may subsequently be used for *in vitro* and *ex vivo* studies. Insights from these experiments may be implemented in the animal studies, creating a feedback loop.

Reduction: Before we start the experiments in which we will administer and remove known and novel circulating factors, we will first characterize and optimize our model. This will ensure that subsequent experiments can make use of a reliable model with minimized variation in our main outcome parameter E/E' (ratio between early mitral inflow velocity and early diastolic velocity of mitral annulus). This allows us to use fewer animals in our designed experiment. Statistical power analysis is subsequently used to determine the minimum number of animals per group needed to detect a change in the main outcome variable. Each animal in this study will be followed longitudinally, generating multiple results from a single animal, e.g. blood pressure, heart function and kidney function over time.

Refinement: Before we start the experiments in which we will administer and remove known and novel circulating factors, we will first characterize and optimize our model. We will be able to titrate DOCA and dietary salt to develop a 'mild' and 'severe' model of CRS in the obese ZSF1. This will ensure that subsequent experiments can make use of a reliable model with minimized variation in our main outcome parameter E/E'. Telemetry can be used to monitor pressure in the left ventricle 24/7. This realises a vast amount of reproducible data from a relatively low number of animals. Samples derived from animal experiments will be investigated and cultured and results obtained from these experiments can be implemented back into our experimental design. This longitudinal tracking will also allow us to remove animals from the study that have increased distress. We will make use of optimized protocols for working with ZSF1 animals and pain relief. This will be done in close coordination with the IvD and experts in the field.

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

All animals will be measured longitudinally [REDACTED] This allows us to monitor disease development and progression without performing experiments on a very regular basis. Model optimization and characterization will also allow us to have extensive knowledge on disease development and progression before **Step 2** and **Step 3 and 4** are initiated. **Step 1** will also allow us to titrate the DOCA pellet concentration and the dietary salt concentrations. The longitudinal measurements in **all Steps** will subsequently help us to actively take animals out of the study that shows signs of increased distress (see **Humane endpoints**).

All animals will be housed under standard conditions. Telemetry will require the animals to be placed on smart pads 24/7. However, recent developments have allowed for the manufacturing of smart pads which permits the housing of animals in pairs or trios. If possible, this will be applied. However, solitary housing is necessary during urine collection in metabolic cages. Animals will be housed solitary for a maximum of 24 hours [REDACTED]. If possible, we will use the shortest time frame for this collection.

In close coordination with the IvD and experts in the field, we will generate an optimized protocol for pain relief in these animals after intra-abdominal implanted telemeters and subcutaneous DOCA pellets.

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.

For the telemetry implantation an optimized pain relief protocol (e.g. concentrations and frequency) will be drafted after consulting literature in which telemeter implantation into the left ventricle has been performed and from previous experiences in this field at our department. General anesthesia will be induced by using a mixture of 2-4% isoflurane in oxygen and air in an induction chamber. The anesthesia will be maintained during the surgery by delivering 0.5-2% isoflurane in oxygen and air by mechanical ventilation via tracheal intubation. Analgesia with morphine analogues (buprenorphine) will be administered pre- and post-surgery as a routine procedure. Post-surgical buprenorphine will be given subcutaneously for 36 hours with an interval of 12 hours to warrant pain relief of the animals. During surgery lidocaine will be used locally before a skin incision is made and bupivacaine before closing the muscular layer.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

General: Even though all surgeries occur under strict sterility, implantation of a telemeter or a subcutaneous DOCA pellet may lead to wound infection. Animals may thus develop fever or inflammation.

Specific:

Lean ZSF1 rats are healthy

Lean ZSF1 rats with DOCA+ dietary salt may develop mild CRS

Obese ZSF1 rats with or without DOCA+ dietary salt and both mild and marked CRS

Weight loss (more than 15% of body weight at the start of the protocol at 3 months of age)

Shallow breathing

Since model characterization will give us more insight into the development and progression of disease in animals with mild and marked CRS, adverse effects on welfare are currently regarded as being similar to those found in obese ZSF1 rats.

After the characterization phase, model-specific adverse effects and their influence on possible HEPs will be adjusted in consultation with the IvD.

Explain why these effects may emerge.

In general, chronic conditions such as CKD and HF can lead to weight loss.

Diastolic heart failure is specifically associated with lung edema resulting in shallow breathing. Peripheral edema occurs in humans but uncommon in rodents until they develop marked HFrEF.

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

Salt intake can be reduced. DOCA pellets can be removed. Moreover, the purpose of the first phase is to define two levels of heart failure and kidney failure: mild and relatively marked at which we can test pathogenic and therapeutic candidate substances and drugs, respectively.

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.

The development of HFrEF will be a humane endpoint, [REDACTED]. Also humane endpoints due to model-related complications are expected such as shortness of breath. Severe weight loss of more than 15% of the body weight at 3 months of age will also be seen as a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

Cumulatively, we expect to reach humane endpoints in 10% of the animals with mild CRS, thus 90% survival, with HEPs primarily due to technical problems related to anaesthesia required for longitudinal measurements and telemeter implantation. In animals with marked CRS we expect 25% to reach human endpoints, thus 75% survival, primarily due to the same technical problems, but also due to severe weight loss and shallow breathing.

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 discomfort. Due to the inclusion that reaching HFrEF is a humane endpoint we do not expect that severe discomfort will occur [REDACTED] is already a strict point after consultation with a cardiologist. The performed procedures vary from mild to moderate. Procedures with mild discomfort include the addition of dietary salt to chow, metabolic cages, blood sampling, a one-time implantation of the subcutaneous DOCA pellet, and recovery from anesthesia and tail-cuff blood pressure measurements. The use of the latter is preferred in this project as it is non-invasive, easy to perform method and the longstanding expertise with this method at our department. Procedures with moderate discomfort include instrumentation of the animal with intra-abdominal telemetric catheters and transmitters, the possible implantation of a subcutaneous osmotic pump and the longitudinally performed measurements requiring repeated anesthesia or solitary housing in a metabolic cage.

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.

Animals will be killed after the experiment since extensive work will be conducted on heart and kidney tissue, cells and samples (e.g. blood, urine). To this end we will use a variety of techniques. These include: immunohistochemistry (IHC) to define vascular, inflammatory and fibrotic changes, molecular biology to define changes in gene and protein expression, clinical chemistry to define changes in renal function. Other relevant tissues (e.g. lungs, brain, spleen, etc.) will also be collected to assess wet and dry weight, morphology and vascular, inflammatory and fibrotic changes. Isolated microvasculature will also be studied *ex vivo* in organ chamber and culture systems. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements allow correlation between disease development and progression.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.547.049
2. Titel van het project : Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome
3. Titel van de NTS : De wisselwerking tussen nierziekte en hartziekte

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ☒ ontvangen door DEC: 08-01-2016
☐ aanvraag compleet:
☒ in vergadering besproken: 20-01-2016 en 17-02-2016
☒ anderszins behandeld: per mail: 22-02-2016
☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 22-01-2016 tot 05-02-2016
19-02-2016 tot 22-02-2016
☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
☐ aanpassing aanvraag:
☒ advies aan CCD: 08-03-2016

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: 22-01-2016
- Strekking van de vragen:

Algemeen

- De DEC complimenteert u met de inbedding van dit project in de Reconnect studie omdat de wisselwerking dierexperimenteel onderzoek en (humaan) patiënten onderzoek zo mooi naar voren komt.

Formulier projectaanvraag

- Vraag 1e: U hebt deze vraag niet ingevuld. Graag alsnog doen.

Niet Technische Samenvatting

- Algemeen: De DEC verzoekt u de NTS goed te controleren op schrijffouten en dit aan te passen.
- 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: Het aantal dieren voor training komt niet overeen met het aantal dieren in het projectvoorstel. Graag aanpassen. Ook adviseert de DEC het aantal dieren voor training te beperken tot het aantal benodigd voor deze aanvraag.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: U noemt hier twee categorieën; dit is echter niet terug te vinden in het projectvoorstel. Graag consistent invullen.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Als criterium voor hartfalen wordt het dalen van de ejectiefractie genoemd, maar vervolgens wordt de voor het onderzoek belangrijke groep van patiënten met hartfalen genoemd die een normale ejectiefractie heeft. Dit zorgt voor verwarring, omdat het niet duidelijk is waarom er dan toch nog sprake is van hartfalen en waarom deze patiëntengroep in het kader van uw vraagstelling zo belangrijk is. Dit moet verduidelijkt worden. De DEC adviseert u een cardioloog mee te laten kijken met het beantwoorden van de vragen en daarmee het verbeteren van de aanvraag.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de definities toe te lichten met klinische terminologie en de afkortingen wat vaker voluit te schrijven in verband met de leesbaarheid.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u aandacht te besteden in uw tekst aan systolisch en diastolisch hartfalen met de bijbehorende pathofysiologische kenmerken.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: 3.4.2: U gebruikt veel herhalingen. De DEC verzoekt u dit te vermijden. Tevens verzoekt de DEC u duidelijker te beschrijven wat u doet in respectievelijk stap 2 en 3.

Bijlage

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij stap 2 missen voorbeelden van circulating factors, de DEC vraagt zich af welke u precies bedoelt en aandacht te besteden aan dosering, tijd en hoeveelheid toedieningen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of het correct is dat er in de titel van stap 3 zowel 'adding' als 'removal' staat. Graag toelichten en zo nodig aanpassen.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u wat duidelijker te beschrijven waarom er zowel een mild als marked CRS-model nodig zijn voor het beantwoorden van de vraagstelling. Graag ook opnemen in de flow chart (figuur 3).
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, pagina 2, alinea 2: [REDACTED]
[REDACTED] De DEC verzoekt u de herhaling te verwijderen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, pagina 2: De DEC verzoekt u de zin 'in other words, a severe model might be ?' te verduidelijken.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, stap 4: U noemt hier het mild model, maar de DEC heeft het idee dat u het marked model bedoelt. Zo nodig graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U noemt hier humane eindpunten die u niet onder J noemt. Graag consistent invullen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U hebt een Nederlandse zin in dit stuk opgenomen. Graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Uw argument om bij stap 2a age-matched controls te gebruiken is niet valide. Graag beter beargumenteren of weglaten, omdat er altijd age-matched controles nodig zijn.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U noemt voor de training een ander aantal dieren dan onder B en in de NTS. Graag consistent invullen. De DEC adviseert u daarbij alleen het aantal dieren te berekenen dat u nodig hebt voor dit project en goed te bedenken of een dergelijk hoog aantal nodig is. Bovendien noemt u dat er training plaatsvindt ten behoeve van een ander project, hetgeen de CCD niet zal accepteren. De CCD heeft u immers geadviseerd een apart trainingsproject te schrijven voor niet project gebonden opbouw van expertise.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of het mogelijk is om de dieren geïnstrumenteerd aan te laten leveren, om de training te kunnen schrappen. Graag uw visie.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u de laatste alinea te verplaatsen naar punt D, aangezien dit gaat over vervanging.
- B. De dieren: De DEC vindt uw argumentatie voor het gebruik van mannelijke ratten onvolledig; u wilt graag breed kijken, maar beperkt u dan door te kiezen voor één sekse. De DEC zou liever, in het kader van hun vraagstelling, ook een klein cohort vrouwen zien. Wellicht kunt u ervoor kiezen om bij surplus ratten enkel vrouwelijke dieren te nemen.
- B. De dieren: De DEC mist een vehikelgroep en vraagt zich af of u hier rekening mee hebt gehouden.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC verzoekt u beter te motiveren waarom u niet nu al een optimaal pijnstillingsprotocol opstelt.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: U noemt hier onder meer 'reduced exercise tolerance'. Het is de DEC echter niet duidelijk hoe u dit vaststelt. Graag toelichten.

- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: De DEC heeft het idee dat u tachypneu bedoelt in plaats van dyspneu. Graag toelichten.
- J. Humane eindpunten en K. Classificatie van ongerief: De DEC acht het in deze fase, waarin u de modellen nog moet ontwikkelen, niet realistisch is om te spreken over matig ongerief en vraagt u, in overleg met de IvD, een scoringssysteem te ontwikkelen voor de humane eindpunten. De DEC voorziet dat in de ontwikkelingsfase ook ernstig ongerief zou kunnen optreden hetgeen noodzaakt om goede humane eindpunten gedefinieerd te hebben.
- K. Classificatie van ongerief: Het is de DEC niet duidelijk of er meerdere keren DOCA pellets geplaatst moeten worden en wat dit betekent voor het ongerief. Graag toelichten.
- K. Classificatie van ongerief: De DEC vraagt zich af of u een alternatieve methode kunt gebruiken in plaats van de tail-cuff. Graag uw visie.
- Datum antwoord: 05-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

Formulier projectaanvraag

- De bedoelde vraag kunnen we niet vinden in de documenten, naar ons weten is alles ingevuld. Welke vraag wordt er bedoeld?

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: In de huidige aanvraag is er meer aandacht besteed aan het onderscheid tussen de twee typen hartfalen en is verduidelijkt waarom de patiëntengroep met hartfalen met een bewaarde ejectie fractie voor ons belangrijk is. Hieronder volgt een uitleg in het Nederlands: HFrEF, waarin de ejectie fractie daalt, wordt ook wel aangeduid als systolisch hartfalen. Een kenmerk hiervan is het minder krachtig pompen van het hart doordat de hartwand onvoldoende samentrekt om bloed uit het ventrikel te persen. Systolisch hartfalen wordt vaak gezien na een hartinfarct, waarbij een deel van de hartspier afsterft door de plotse blokkade van bloedtoevoer. Een verdunning van de hartwand treedt dan op. Aangezien de ejectie fractie gedefinieerd is als de fractie bloed dat uit de ventrikels wordt geperst per contractie, zal deze dus dalen. HFpEF, waarin de ejectie fractie bewaard is, wordt ook diastolisch hartfalen genoemd. Deze wordt vaak gekenmerkt door een abnormale diastolische functie, doordat verstijving of hypertrofie van het linker ventrikel optreedt. Door de verstijving kunnen de ventrikels niet meer goed relaxeren waardoor ze zich niet meer goed kunnen vullen met bloed. Bij fysieke inspanning wordt het hart dan functioneel verhinderd omdat het niet meer bloed kan rondpompen en symptomen van hartfalen kunnen zich dan voordoen. Juist deze HFpEF populatie is voor dit project belangrijk aangezien therapieën voor deze groep schaars zijn vergeleken met die voor HFrEF. Ook over de oorzaak en het ontstaan van HFpEF is slechts weinig bekend. Wel weten we dat het ontstaan van HFpEF samengaat met chronische nierfalen (CKD). Patiënten met een lichte vermindering van de nierfunctie, als gevolg van metabole componenten zoals diabetes, obesitas of hypertensie, lopen een veel hoger risico om HFpEF te ontwikkelen. Zo is CKD

veelvoorkomend in HFpEF, in ongeveer 26-53% van de patiënten. De combinatie van een verslechterde nierfunctie en HFpEF leidt ook tot een slechtere uitkomst en verhoogde mortaliteit in deze groep. Om deze redenen is deze patiëntenpopulatie met HFpEF en CKD voor ons interessant. Tevens is er na overleg met de cardioloog besloten om te kiezen voor de E/E' ratio als de primaire uitleesparameter in plaats van de E/A. De E/E' ratio wordt gebruikt voor het bepalen van linker ventriculaire druk tijdens het vullen van de ventrikel (Nagueh et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. J. Am. Soc. Echocardiography 2009;22:107-133).

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Deze variabele wordt wel

meegenomen in de longitudinale metingen. Deze veranderingen zijn dan ook opgenomen in de aanvraag.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Op dit moment is het nog niet bekend naar welke circulerende factoren wij zullen gaan kijken. Het is de bedoeling dat deze factoren geleverd zullen worden vanuit de work packages 1 en 2 van het RECONNECT consortium. Vervolgens zullen wij deze verder gaan valideren in het model dat in onze aanvraag beschreven wordt. Hierbij willen we graag het belang van de wisselwerking tussen de work packages 1 en 2 benadrukken voor dit project. Het doel van het ontwikkelen van zowel het milde als het marked CRS model is puur om factoren die geïdentificeerd zijn uit de patiënt databases en in vitro analyses verder te valideren, niet om met ons model nieuwe factoren te gaan identificeren. Voorbeelden van mogelijk betrokken factoren in de progressie van CRS zijn vasoconstrictors, inflammatoire factoren, groeifactoren ([REDACTED]), matrix vormende eiwitten of uremische toxines. Het tijdstip waarin we deze factoren gaan toedienen in ons model is afhankelijk van de uitkomsten verkregen uit de karakterisatie van het model in de eerste stap. De dosering, frequentie en route van toediening hangt af van het type factor dat gevonden is. Bijvoorbeeld voor de manier van toediening, als het een eiwit betreft dan zal dit toegediend worden via een subcutane osmotische pomp terwijl in het geval van een lipofiele stof dit oraal gegeven zal worden.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is inderdaad incorrect dat er zowel 'adding' als ook 'removal' staat. Excuus hiervoor. Dit is nu in de aanvraag aangepast zodat de stappen allemaal consistent zijn en dat duidelijk is wat er precies in welke stap gebeurt.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de aanvraag wordt het belang van het ontwikkelen van het milde en het marked model beter benadrukt en tevens is dit in de flow chart verwerkt. Voor dit project zijn zowel het milde als het marked CRS nodig. In stap 2 wordt het milde CRS model gebruikt om te zien of door het toedienen van de circulerende stoffen een erger fenotype veroorzaakt kan worden dat vergelijkbaar is aan de situatie van het marked CRS model. Het marked CRS model dient in deze stap dan ter controle voor het ergere fenotype. Andersom wordt in stap 3 het marked CRS model gebruikt om te zien of het inhiberen van de schadelijke circulerende factors leidt tot een milder

fenotype van de ziekte. Het milde CRS model dient dan als een referentie waarde voor het mildere fenotype.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het aantal dieren voor de training is verlaagd en zodanig aangepast dat deze consistent is in de aanvraag. We willen graag benadrukken dat de trainingen genoemd in deze aanvraag specifiek zijn voor alleen dit project, training voor een ander project vindt niet plaats.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is mogelijk om de dieren geïstrumenteerd aan te laten leveren om via telemetrie de bloeddruk te kunnen meten. Voor arteriële druk is het mogelijk om de katheter van de telemeter via de abdominale aorta, de a. carotis of de a. femoralis in te brengen. Voor het meten van de linker intraventriculaire druk, zal de katheter door het diafragma in de apex van het linker ventrikel ingebracht moeten worden. Als we dit zouden doen via de abdominale aorta, dan zouden we door het implanteren van de katheter een aortaklep insufficiëntie creëren. Vanwege de complexe operatie en om ervoor te zorgen dat de benodigde vaardigheden goed verworven worden, zal er een externe cursus voor het implanteren van de telemeter gevolgd gaan worden bij het René Remie Surgical Skills Centre in Almere (<http://www.rrssc.eu/>). Deze is door Millar (waarvan we het telemetriesysteem gebruiken) aangewezen als het Europese trainingscenter voor de telemetrie implantatie. De verworven kennis tijdens deze cursus zal gedeeld worden met de andere betrokken personen in dit project en technicians van het gemeenschappelijke dierenlaboratorium (GDL) zodat we de expertise op het gebied van telemetrie implantatie voor linker intraventriculaire drukmeting min of meer permanent in huis hebben.
- B. De dieren: Bij nader inzien een valide punt. De aanvraag is zodanig aangepast dat we ook vrouwelijke ratten zullen gebruiken in Stap 1a voor karakterisatie en optimalisatie van het diermodel. Afhankelijk van de resultaten die we in deze stap zullen krijgen, zal bepaald worden met welke sekse verder gegaan zal worden. Voor de praktische haalbaarheid om de vraagstelling te kunnen beantwoorden is het belangrijk [REDACTED] [REDACTED] zowel het milde als het marked CRS verkregen moet worden.
- B. De dieren: Deze opmerking hebben we ook in onze aanvraag verwerkt, voor de groepen die geen DOCA + zout zullen ontvangen zal er een placebo pellet subcutaan geïmplantéerd worden. Op deze manier zullen alle groepen een pellet krijgen (<http://www.innovrsrch.com/product/productInfo.asp?name=PLACEBO>).
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Helaas is het niet mogelijk om de gereduceerde inspanningstolerantie gestandaardiseerd te meten in ons laboratorium en zijn we te voorbarig en enthousiast geweest. Hierbij willen we dan ook het gedeelte over de gereduceerde exercise tolerantie intrekken.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Het gebruik van de term dyspneu is gewijzigd in de aanvraag om het te verduidelijken. Wat wij bedoelen is dat door de progressie van CRS de dieren oppervlakkiger kunnen gaan ademen.
- K. Classificatie van ongerief: De DOCA-pellet zal slechts één keer geplaatst worden tijdens het experiment. [REDACTED]

██ Het ongerief zal licht zijn doordat deze pellet maar een keer subcutaan geplaatst zal worden.

- K. Classificatie van ongerief: Voor dit project is gekozen voor het meten van de bloeddruk met behulp van de tail-cuff omdat het een niet invasieve en eenvoudig uit te voeren methode is. Tevens bestaat er een jarenlange expertise op het gebied van deze techniek op onze afdeling aangezien het veelvuldig gebruikt wordt in experimenten (>40 originele publicaties). De telemetrie voor het meten van de linker intraventriculaire druk wordt toegepast in een subgroep van de dieren. Om dit te doen voor alle dieren is praktisch en financieel niet haalbaar.

- Datum: 19-02-2016
- Strekking van de vragen:
Projectvoorstel
- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert om in de inleiding duidelijker naar voren te laten komen dat er bij systolisch hartfalen een ejectiefractiedaling is en dat bij diastolisch hartfalen dit in rust niet voorkomt, maar dat dit pas tot uitkomt bij inspanning
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Gewichtsverlies: Hier moet genoemd worden in welk tijdsbestek dit gewichtsverlies gemeten moet worden. Verder zou er door oedeemvorming ook gewichtstoename kunnen voorkomen. Hier moet ook aandacht aan besteed worden, ook in de bijlage. Invullen in overleg met de IvD.

- Datum antwoord: 22-02-2016
- Strekking van het antwoord:
- De opmerkingen zijn verwerkt in zowel het projectvoorstel als in de bijlage. Tevens is vraag 1 ook ingevuld op het aanvraagformulier.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- ☐ wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Hartfalen is een wereldwijd veelvoorkomende aandoening die gepaard gaat met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Men kan grofweg twee vormen van hartfalen onderscheiden: systolisch en diastolisch hartfalen. De mechanismen die ten grondslag liggen aan systolisch hartfalen zijn bekend en voor de behandeling van patiënten zijn verscheidene therapeutische interventies voorhanden. Dit geldt niet voor diastolisch hartfalen. Veel patiënten met diastolisch hartfalen leiden aan comorbide aandoeningen, zoals obesitas, diabetes, hypertensie en chronisch nierfalen. Dat maakt diastolisch hartfalen tot een complexe aandoening. Bovendien kan een wisselwerking tussen verschillende aandoeningen ertoe leiden dat zij elkaars verloop versnellen en de prognose van de patiënt verslechteren. Het is bekend dat een dergelijke wisselwerking optreedt bij patiënten met chronisch nierfalen en diastolisch hartfalen. Dit is het zogenaamde 'cardiorenale syndroom' (CRS). De onderliggende mechanismen zijn grotendeels onbekend en tot op heden is alleen een symptomatische behandeling van de aandoening mogelijk. Er zijn aanwijzingen dat circulerende factoren (zoals vasoconstrictors, matrixvormende eiwitten en uremische toxines) die vrijkomen bij chronisch nierfalen en diastolisch hartfalen een negatief effect hebben op de coronaire respectievelijk renale microvasculatuur, en zo het ziekteverloop versnellen. Met behulp van een nieuw rattenmodel wil de aanvrager deze aanwijzingen nader onderzoeken en de onderliggende mechanismen van het cardiorenale syndroom in kaart brengen. Dankzij de inbedding van het project in een groot consortium kunnen de verkregen inzichten op termijn mogelijk ook bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische interventies en diagnostische en prognostische testen.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project is opgedeeld in vier logisch op elkaar volgende fasen. Eerst wordt het nieuwe rattenmodel gekarakteriseerd en geoptimaliseerd (stap 1). De experimenten moeten ertoe leiden dat in de dieren op betrouwbare en reproduceerbare wijze een mild of uitgesproken CRS bewerkstelligd kan worden. Met behulp van verschillende *in vivo*, *ex vivo* en *in vitro* metingen worden structurele en functionele veranderingen in het hart en de nieren in verschillende stadia van het ziekteproces in kaart gebracht. Daarna wordt de invloed van verschillende circulerende factoren op het ziekteverloop onderzocht. De keuze voor de te

onderzoeken circulerende factoren zal gebaseerd zijn op literatuuronderzoek en patiëntstudies die uitgevoerd worden in het kader van het consortium waar dit project onderdeel van is. De circulerende factoren worden toegediend aan dieren met een mild CRS (stap 2) en verwijderd/geblokkeerd bij dieren met een uitgesproken CRS (stap 3). Vervolgens wordt bekeken of dit leidt tot een meer uitgesproken (stap 2) of milder (stap 3) fenotype van het CRS. Op deze wijze kunnen circulerende factoren geïdentificeerd worden die als aangrijpingspunt kunnen dienen voor bestaande en nieuwe geneesmiddelen. Vervolgens zullen enkele van deze geneesmiddelen toegediend worden aan dieren met een uitgesproken CRS, waarna de effecten op eerdergenoemde structurele en functionele veranderingen in kaart gebracht kunnen worden (stap 4). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☐ Huisvesting en verzorging
- ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren in bijlage 1 wordt het ongerief ingeschat als matig. Dit ongerief is het gevolg van het herhaaldelijk bijkomen uit de anesthesie die nodig is voor training van experimentele handelingen en de longitudinale metingen van hart- en nierfunctie, van herhaaldelijke solitaire huisvesting in een metabole kooi, en (bij een deel van de dieren) van implantatie van een telemeter. De verwachting is dat voorkomen kan worden dat de dieren ten gevolge van het geïnduceerde milde/uitgesproken CRS meer dan matig ongerief ervaren, door ze intensief te monitoren en te euthanaseren zodra een van de humane eindpunten bereikt wordt. Een belangrijk aspect daarbij is het monitoren van de ejectiefractie van het linker ventrikel (voor details, zie C9). Men houdt er rekening mee dat maximaal 10% van de dieren met een mild CRS het humane eindpunt bereikt door technische complicaties die gerelateerd zijn aan de anesthesie die vereist is voor de uitvoering van de longitudinale metingen en de implantatie van de telemeters. Bij de dieren met een uitgesproken CRS houdt men rekening met een uitval van 25%. Deze uitval is het gevolg van eerdergenoemde technische complicaties en euthanasie die vereist is wanneer bepaalde modelgerelateerde complicaties (gewichtsverlies en oppervlakkige ademhaling) optreden.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De (deels nog op te helderen) interacties tussen organen, weefsels en cellen die ten grondslag liggen aan het cardiorenaal syndroom zijn dusdanig complex, dat deze niet niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden, waardoor *in vivo* experimenten noodzakelijk zijn. De voorgestelde dierproeven worden zoveel mogelijk aangevuld met resultaten uit *in vitro* en *ex vivo* experimenten. Deze experimenten zullen worden uitgevoerd met behulp van dierlijk materiaal en materiaal afkomstig van patiënten en gezonde proefpersonen. Op deze wijze wordt reeds in een vroeg stadium van het onderzoek gewerkt aan de verificatie en translatie van resultaten uit dierexperimenten. In verband met de opzet van het onderzoek (het toedienen van circulerende factoren die het ziekteproces kunnen verergeren) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere morfologisch onderzoek van hart en nieren) is het niet mogelijk om het onderzoek rechtstreeks in mensen uit te voeren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het te gebruiken diermodel zal eerst uitgebreid gekarakteriseerd en geoptimaliseerd worden (stap 1), zodat de daaropvolgende experimenten (stappen 2 t/m 4) uitgevoerd kunnen worden in een betrouwbaar model met minimale variatie in de uitleesparameter. Om uitval van dieren om technische redenen zoveel mogelijk te voorkomen worden verschillende experimentele handelingen (zoals echocardiografie, imaging van de coronaire microvasculatuur, en het implanteren van een telemeter) uitvoerig geoefend voorafgaand aan de experimenten. Invasieve ingrepen worden onder terminale anesthesie uitgevoerd. Niet-invasieve ingrepen worden uitgevoerd onder lichte inhalatieanesthesie waaruit de dieren na afloop van de training bijkomen. Op deze manier kunnen dieren herhaaldelijk voor trainingsdoeleinden ingezet worden. Daarnaast wordt waar mogelijk gebruik gemaakt van surplusdieren. Voorafgaand aan de dierexperimenten zal met behulp van een poweranalyse bepaald worden hoeveel dieren nodig zijn om statistisch relevante verschillen tussen groepen te kunnen detecteren. Door de proefdieren longitudinaal te volgen en bij elk dier verschillende *in vivo*, *ex vivo* en *in vitro* metingen te verrichten worden de proefdieren zo efficiënt mogelijk ingezet. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft ervaringen met een groot deel van de te verrichten experimentele handelingen. Vaardigheid met betrekking tot het implanteren van telemeters zal verworven worden door middel van een externe cursus. Ook andere experimentele handelingen zullen voorafgaand aan de experimenten uitvoerig geoefend worden om onnodig ongerief en ongewenste variatie te voorkomen. Voor de karakterisatie en optimalisatie van het diermodel (stap 1) zullen zowel vrouwelijk als mannelijke dieren ingezet worden. Op basis van de verkregen resultaten zal bepaald worden welke sekse het meest geschikt is voor de vervolgentexperimenten (stap 2 t/m 4). De criteria met betrekking tot hart- en nierfunctie aan de hand waarvan bepaald

wordt of een mild dan wel uitgesproken CRS bewerkstelligd is zijn helder (stap 1). De ejectiefractie van het linker ventrikel in rust zal ook beoordeeld worden, omdat deze iets zegt over de vorm van hartfalen. Diastolisch hartfalen wordt namelijk gekenmerkt door behoud van de ejectiefractie in rust. Wanneer de ejectiefractie in rust onder een bepaalde drempelwaarde komt spreekt men van systolisch hartfalen. Als blijkt dat een dier systolisch hartfalen heeft ontwikkeld, dan wordt dit beschouwd als een humaan eindpunt en wordt het betreffende dier geëuthanaseerd. De interventies in de vervolgexperimenten (stap 2 t/m 4) zullen alleen uitgevoerd worden wanneer vastgesteld is dat bij de dieren de gewenste vorm van CRS is bewerkstelligd (go/no-go). Om ongerief zoveel mogelijk te beperken worden adequate en op de experimentele handelingen afgestemde analgesie- en anesthesieprotocollen toegepast. Wanneer na een chirurgische ingreep blijkt dat een dier onvoldoende herstelt, dan worden ondersteunende maatregelen getroffen (weekvoer, aanvullende analgesie en solitaire huisvesting). Mocht een dier desondanks in conditie verslechteren, dan wordt het geëuthanaseerd.

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

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – het in kaart brengen van de onderliggende mechanismen van het cardiorenaal syndroom en het ontwikkelen van nieuwe therapeutische interventies – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat het diermodel en de beschreven experimenten noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. Het vernieuwende multimorbide rattenmodel vormt een betere benadering van het cardiorenaal syndroom in mensen dan gangbare diermodellen die op één aandoening focussen. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. Waar mogelijk worden ter ondersteuning/aanvulling van de *in vivo* experimenten ook *in vitro* en *ex vivo* experimenten uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. De proefdieren worden zo efficiënt mogelijk ingezet door bij elk dier longitudinale, terminale en post mortem metingen te verrichten, die samen een compleet beeld geven van het ziekteverloop. Het voorliggende project vormt een belangrijke schakel in een reeks experimenten die uitgevoerd worden in het kader van het consortium RECONNECT. Dit draagt in grote mate bij aan de haalbaarheid van de doelstelling de translatie van de behaalde resultaten naar de mens. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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
AVD115002016462

Bijlagen

2

Datum 14 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016462. 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: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] Nieuwe aanvraag
☐ [] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
☐ [] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2016
Geplande einddatum: 31 december 2020
Titel project: Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome
Titel niet-technische samenvatting: De wisselwerking tussen nierziekte en hartziekte
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Beschrijving Dierproeven
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utrecht

Datum:

9 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU -ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**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
AVD115002016462
Bijlagen
2

Datum 14 maart 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 maart 2016
Vervaldatum: 13 april 2016
Factuurnummer: 16700462
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016462	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 18 april 2016 10:06
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: vraag bij AVD115002016462

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw project "mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462. Wij hebben nog 1 vraag om aanvullende informatie voor u.

U beschrijft in de bijlage dierproeven bij stap 1A dat u een vergelijking maakt tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Op basis van de uitkomsten van dit eerste experiment maakt u een keuze tussen mannelijke of vrouwelijke dieren voor de vervolgstappen. Onze vraag is of u bij gelijke uitkomsten en dus geen onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren de vervolgstappen ook met beide geslachten dieren uit zou kunnen voeren,

Zou u dit willen toelichten?

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!)



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

postadres
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69
info@ivd-utrecht.nl
www.ivd-utrecht.nl

uw kenmerk
ons kenmerk

datum 20 april 2016
onderwerp Antwoorden AVD115002016462

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw brief d.d. 18 april 2016.

Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 16 juni 2015.

Met vriendelijke groet

[Redacted signature block]

Geachte [REDACTED]

Wij bedanken de CCD voor de nauwkeurige beoordeling van ons project “mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome” (aanvraagnummer AVD115002016462) en geven graag antwoord op uw vraag om aanvullende informatie over de dierproeven in stap 1A waar wij een vergelijking willen maken tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Op basis van de uitkomsten van dit eerste experiment wilden wij in eerste instantie een keuze maken tussen mannelijke of vrouwelijke dieren voor de vervolgstappen.

Uw vraag is of bij gelijke uitkomsten en dus geen onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren wij de vervolgstappen ook met beide geslachten dieren uit zou kunnen voeren. Dit is een complexe en uitdagende uitkomst waarop verschillende strategieën gevolgd kunnen worden. Om kort te gaan, wij vinden het prematuur om hierover nu al een definitieve keuze te maken. Dit zullen wij hieronder uiteraard nauwkeurig toelichten.

Eigenlijk verwachten wij al dat het model verschillend is omdat in dit rattenmodel nierfunctie verlies volgens de literatuur langzamer is bij vrouwen dan bij mannen [1]. De huidige keuze voor geslacht in Stap 2 en verder is ‘slechts’ gebaseerd op het feit dat er zowel een stabiel mild als marked fenotype kan worden gegenereerd binnen een aanvaardbaar tijdsbestek en dat ondanks verschillen in voortgang van nierfunctieverlies tussen de geslachten, stabiele fenotypes van hartfalen in beide geslachten te bereiken zijn.

Dit verschil in voortgang tussen de geslachten binnen het experimentele model vinden wij niet van overheersend belang voor onze mechanistische vragen.

[REDACTED]

en uw vraag wijst ons weer op de noodzaak om dit nu te gaan doen!

[REDACTED]

Mochten de mannen ‘te snel’ afglijden naar HFREF, dan is dat een argument om met vrouwen door te gaan: anders dreigt te vaak een humaan eindpunt in Stap 2 (toevoegen circulating factors). Mocht de afname in hartfunctie in vrouwen te lang duren, of gelijke afname bereikt worden met een veel vaster protocol dan in mannen, dan is dat een argument om met mannen door te gaan.

Een andere mogelijkheid is om na Stap 1 verder te gaan met gemengde groepen (met een gelijk aantal mannen en vrouwen).

[REDACTED]

Dit gaat onze logistiek en financiën ver te boven. Daarom verkiezen wij de optie om een rationele keuze “en route” te maken volgens voornoemd plan.

Kortom, wij willen beide opties open houden en onze mogelijkheden zeker nu nog niet gaan beperken. Uiteraard zullen wij alles Stap voor Stap met de IvD overleggen. Mocht het nodig zijn dan komen wij terug bij de CCD met een wijziging waarbij wij uitbreiding van het aantal dieren aanvragen.

Vriendelijke groet,

[REDACTED]

1. Babelova et al. Sex-differences in renal expression of selected transporters and transcription factors in lean and obese Zucker spontaneously hypertensive fatty rats. J Diabetes Res. 2015: 483238

From: [Info-zbo](#)
To: [REDACTED]
Cc: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Subject: vraag bij AVD115002016462
Date: maandag 18 april 2016 10:07:35

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw project "mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462. Wij hebben nog 1 vraag om aanvullende informatie voor u. U beschrijft in de bijlage dierproeven bij stap 1A dat u een vergelijking maakt tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Op basis van de uitkomsten van dit eerste experiment maakt u een keuze tussen mannelijke of vrouwelijke dieren voor de vervolgstappen. Onze vraag is of u bij gelijke uitkomsten en dus geen onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren de vervolgstappen ook met beide geslachten dieren uit zou kunnen voeren,

Zou u dit willen toelichten?

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!)



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

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
AVD115002016462

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 26 april 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD. Uw antwoord volstaat: u maakt de keuze voor het inzetten van een of beide geslachten na fase 1 in uw project in overleg met de IvD. In geval u het aantal dieren op uw vergunning wilt uitbreiden door het inzetten van beide geslachten in het vervolg van uw project na fase 1 dan doet u dit middels een wijzigingsaanvraag.

De CCD spreekt haar waardering uit over de wijze waarop u in vitro en in vivo onderzoek parallel uitvoert binnen uw project en de manier waarop u de mogelijkheden tot 3V toepassingen heeft beschreven.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). De algemene voorwaarden betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2016 tot en met 31 december 2020 hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aangevuld met twee algemene voorwaarden.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv 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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Promovendus verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 11 maart 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 11 maart 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 8 maart 2016, ontvangen op 11 maart 2016;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 April 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Cardiac and renal function and structure in the obese ZSF-1 rat	Ratten (Rattus norvegicus)	1230	Matig	In totaal worden 1230 dieren ingezet. Dit zijn n=150 voor training, n=256 Lean ZSF1 ratten, n=824 obese ZSF1 ratten

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet 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 verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade

Datum

26 april 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD115002016462

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.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 10 mei 2016 9:18
Aan: 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'
Onderwerp: teugkoppeling besluit AVD115002016462

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waar uw DEC advies over heeft uitgebracht. Het betreft het project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraag nummer AVD115002016462, uw interne code 2015.II.547.049.

Op basis van uw advies heeft de CCD besloten de aanvraag te vergunnen, aan de vergunning zijn twee algemene voorwaarden verbonden om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10a van de wet. De aanvrager is van het besluit op de hoogte gesteld.

De CCD dankt u voor het uitbrengen van uw 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!)