

	Inventaris Wob-verzoek W16-19S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016498								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	

04 APR. 2016



AVD 110002016498

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11000 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Twente</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50130536</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Twente	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50130536									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Twente																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	50130536																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Drienerlolaan</td><td>5</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>217</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>7500 AE</td><td>Enschede</td></tr><tr><td>IBAN</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td></td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Drienerlolaan	5	Postbus	217		Postcode en plaats	7500 AE	Enschede	IBAN			Tenaamstelling van het rekeningnummer		
Straat en huisnummer	Drienerlolaan	5															
Postbus	217																
Postcode en plaats	7500 AE	Enschede															
IBAN																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Assistent Professor</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	Assistent Professor		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	Assistent Professor																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>PhD student</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	PhD student		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	PhD student																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters		Dhr.	Mw.
	Functie			
	Afdeling			
	Telefoonnummer			
	E-mailadres			

1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

☒ Nee

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

☒ Nee > Ga verder met vraag 3

2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☒ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 01 - 05 - 2016

Einddatum 01 - 05 - 2019

3.2 Wat is de titel van het project?

Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of langerhans

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Poreuze microwelconstructen voor transplantatie van eilandjes van Langerhans

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC Utrecht

Postadres [Redacted] Postbus 85500, 3508GA Utrecht

E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 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
- ☒ appendix projectvoorstel; DEC-advies DEC Utrecht

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Enschede

Datum 30 - 3 - 2016

Handtekening 



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11000
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Twente
- 1.3 Provide the title of the project. Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of langerhans

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.

Type 1 diabetes is a disease in which the insulin producing beta cells situated in pancreatic islets of Langerhans are destroyed by the patient own immune system. The total number of people in the world with diabetes is projected to rise from 171 million in 2000 to 366 million in 2030 [1]. To control their

blood glucose level, patients require daily insulin injections need to self-administer exogenous insulin daily. Although, it is effective in regulating blood glucose levels, this method lacks precise glycaemic control which on the long term may cause severe complications like neuropathy, nephropathy and retinopathy, increasing the risk of developing life-threatening diseases [2]. Currently, intra-hepatic islet transplantation is a promising minimal invasive therapy to treat type 1 diabetes [3,4]. However, the decrease of islet mass caused by mechanical stress, the lack of oxygen due to impaired vascularization and the immediate blood mediated immune response as well as a shortage of suitable pancreas donors limit the implementation of this therapy [5,6,7]. To overcome these problems, alternative cell sources such as stem cells or reprogramming of pancreatic exocrine cells are under consideration. Various cell sources that might lead to an adequate supply of beta-cells for replacement therapy have been discussed in detail in [8-9].

Tissue engineering is an interdisciplinary field involving the use of cells and materials to repair or generate specific tissue or organ. These disciplines may be combined to generate artificial islets using an alternative cell source or allogeneic human islets, restore the extracellular matrix interactions and recreate the islets native environment, resulting in a three-dimensional tissue-engineered construct. We believe that extra-hepatic islet transplantation using tissue engineered constructs might improve the efficiency of clinical islet transplantation. Improving clinical islet transplantation by a tailor-made implant in an extrahepatic site can potentially lead to less donor organs needed for transplantation, a better maintenance of glycemia, and reduced or no use of exogenous insulin, a better control of glycemic levels and less risk of long-term complications. Overall, a significant improvement of quality of life for type 1 patients is to be expected with an improved long-term therapeutic outcome. Although immunosuppressive drugs are still needed in these macroporous implants, the fact that islets can be transplanted in a controlled manner outside of the liver, which is currently the standard transplant location, helps to increase the efficiency of clinical islet transplantation, while allo and autoimmune responses and the so called inflammatory blood mediated immune response are less severe outside of the liver, and blood vessel ingrowth from the host can take place in a very efficient manner allowing for a better survival and function of the islets. Such tailor-made implants can, if successful, be used for delivery of other cell sources: eg. de novo beta cells generated from stem cells, or a combination of adult stem cells or endothelial cells with donor islets to further improve vascularization, modulate local immune responses, and support local tissue regeneration. Obviously, if beta cells can be generated in the near future from a suitable stem cell source, not only a proper delivery vehicle is needed. Such as described here, but this could help overcome donor shortage and could lead to a tremendous increase in type 1 diabetes patients being treated with a specialized implant, rather than only the most severe cases as is done now by intrahepatic islet transplantation.

We have previously shown by in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds, comprising a polymeric biomaterial made of 4000PEOT30PBT70 (Polyactive®), in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type I diabetes. We found that these scaffold-implanted islets behaved similar to control mice implanted under the kidney capsule. In addition, we found that the scaffold architecture, allowed for quick revascularisation, prevented islets from clustering and clumping, and that mice responded very well to glucose tolerance tests. The same mice implanted with just free islets at the same location, were not able to reach normoglycemia and did not show recovery of type 1 diabetes during a 30 days period. We concluded based on this study that the scaffold architecture, consisting of an array of macroporous microwell indentations in a 20 µm thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, about 400 µm in diameter and 350 µm in depth, allowed for a very efficient transplantation and subsequent revascularisation of the islets stimulating their survival and function.

We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analysed the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell [10]. We are developing an upscaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical application. The PEOT-PBT block copolymer family has been approved for human clinical applications, and is available on the market as a controlled drug delivery vehicle, bone filler and cement restrictor, making this a suitable biomaterial for future clinical application. Moreover, we showed that these block copolymers do not elicit a noticeable foreign body response, and islets were quickly vascularized within the first 14 days of implantation. We analyzed the blood vessel ingrowth, blood glucose levels, and response to intra peritoneal glucose tolerance tests and found that the engineered porosity in these scaffolds was crucial for enabling a quick revascularization of the islets. The predefined controlled porosity created by laser drilling which provides the holes in micro-size on surface of scaffold. The method is developed at the University of Twente and provided sufficient entry for vasculature to connect to, and grow into the embedded islets that enabled

endocrine functionality similar to islets transplanted in the gold standard kidney capsule model used in this study.

The advanced microfabrication technique used for creating the dedicated islet scaffolds can be easily applied to many different thermoplastic polymeric biomaterials, such as polyurethane based polymers.

In this study we will investigate a thin-film microwell system based on a clinically approved Polyurethane polymeric biomaterials (C-seal, Polyganics BV), also named PUG, in comparison to the abovementioned biomaterial. The specific aim of this study is investigation in the performance of this implant when up-scaling it from a mouse model to a rat model during a long-term study >30 days). This will be a crucial step towards the further development of a clinically relevant sized scaffold for treatment of type 1 diabetes.

References:

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
2. Nathan D.M, et al., Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1993; 328(23): 1676-85.
3. Shapiro J, Jonathan RTL, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven recipients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230–238.
4. Ricordi C. Islet transplantation: a brave new world. *Diabetes*. 2003; 52: 1595–1603.
5. Biarnes M, et al. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*, 2002; 86(9): P.1161-7.
6. Davalli, A.M., et al., Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes*, 1996; 45(9): 1161-7.
7. Carlsson, G., et al. Influence of microenvironment on engraftment of transplanted beta-cells. *Upsala Journal of medical science*, 2011. 116(1): 1-7.
8. Buitinga M, et al., Microwell Scaffolds for the Extrahepatic Transplantation of Islets of Langerhans. *plos one*, 2013; 8(5):64772.
9. Pagliuca F.W, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells In vitro. *Cell*, 2014; 159: 428–439.
10. Zhou Q, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*.2008; 455, 627-632.

3.2 Purpose

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

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

The aim of this study is to develop an up-scalable non cell-adhesive microwell scaffold platform to be used for extrahepatic islet transplantation. We will investigate a thin-film microwell system in which islets can be individually kept separated in a 20 micrometre thick porous polymer sheet containing an array of microwells, covered by a porous sheet of the same polymer.

We will test the performance of these thin-film microwell implants in a comparative manner during a long- term implantation study in a well-defined type 1 diabetes rat model developed at the UMCG, and ultimately answer the research questions below:

- A) Is it possible to efficiently transplant islets of Langerhans in PUG microwell-scaffold, similar to PEOT-PBT microwell scaffolds in an upscaled type 1 diabetic rodent model (rat)?
- B) Does islet transplantation in a retroperitoneal, peritoneal and subcutaneous site using these scaffolds lead to normoglycemia in diabetic animals comparable to the control group carrying islets respectively under the kidney capsule, peritoneal cavity and subcutaneous?
- C) Is the retroperitoneal site a suitable location as a graft implantation site for thin film islet scaffolds? Or should they be placed in the peritoneal cavity or in a subcutaneous site? (Since the pancreas is a retroperitoneal organ, the site may improve the physiologic behaviour of the transplant.)
- D) Does clinically grade PUG perform similar, or better than 4000PEOT30PBT70 (polyactive) block copolymers when used for islet implantation in terms of biomaterial-tissue response, islet function, survival and revascularization?

3.3 Relevance

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

Type 1 diabetes is a disease in which the insulin producing beta-cells situated in pancreatic islets of Langerhans are destroyed by the patient's own immune system. It is estimated that almost 100,000 children under 15 years of age develop this type of diabetes annually worldwide.

We have previously shown in short-term (30 days) in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds comprising Polyactive in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type 1 diabetes, similar to control mice implanted, with a similar amount of islet mass, under the kidney capsule. The scaffold architecture consists of an array of microwell indentations in a 20 μm thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, $\sim 400\text{ }\mu\text{m}$ in diameter and $\sim 350\text{ }\mu\text{m}$ in depth.

We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analyzed the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell (Buitinga et al., PLOS ONE 2013; 8(5):e64772). We are developing an upscaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical application. The PEOT-PBT block copolymer family has been approved for human clinical applications, and is available on the market as a controlled drug delivery vehicle, bone filler and cement restrictor, making this a suitable biomaterial for future clinical application. Moreover, we showed that these block copolymers do not elicit a noticeable foreign body response, and islets were quickly revascularized within the first 14 days of implantation. We analysed the blood vessel ingrowth, blood glucose levels, and response to peritoneal cavity glucose tolerance tests and found that the engineered porosity in these scaffolds was crucial for enabling a quick revascularization of the islets. The predefined controlled porosity created by femtosecond laser drilling developed at the University of Twente provided sufficient entry for vasculature to connect to, and growth into the embedded islets that enabled endocrine functionality similar to islets transplanted in the gold standard kidney capsule model used in this study. The advanced microfabrication technique used for creating the dedicated islet scaffolds can be easily applied to many different thermoplastic polymeric biomaterials, such as polyurethane based polymers. In this proposal, as a follow-up study in a larger rodent model, we would like to investigate whether a scaffold comprised of Polyurethane (PUG), a clinically approved polymer currently used for gastrointestinal repair produced by Polyganics BV, Groningen productname: C-SEAL®, is able improve the efficacy of islet transplantation, in comparison to Polyactive® scaffolds with the same geometry.

The aim of this study is to develop an upscalable non cell-adhesive microwell scaffold platform to be used for extrahepatic islet transplantation. We will investigate a thin-film microwell system, in which islets are can be individually kept separated in a 20 micrometer thick porous polymer sheet containing an array of microwells, covered by a porous sheet of the same polymer. The aim is to investigate the performance of this implant when upscaling it from a mouse model to a rat model, a crucial next step towards the development of a clinically relevant sized scaffold. The system investigated should not be mixed up with the scaffold that is tested at the UMCG together with the University of Twente that is made of Vivosorb® in DEC 6491, which has a completely different geometry and is composed of a different type of polymer as used in this study. It is good to keep in mind that both C-SEAL and Vivosorb are produced by Polyganics BV, which has received approval for both materials to be used in medical devices.

The aim is to test the performance of these thin-film microwell implants in a comparative manner during a long-term implantation study in a well-defined type 1 diabetes rat model developed at the UMCG.

Research questions:

- A) Is it possible to efficiently transplant islets of Langerhans in PUG microwell-scaffold, similar to PEOT-PBT microwell scaffolds in an upscaled type 1 diabetic rodent model (rat)?
- B) Does islet transplantation in renal capsule, peritoneal cavity or subcutaneously using these scaffolds lead to normoglycemia and is the scaffold condition better than islets transplantation without a scaffold?

3.4 Research strategy

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

In this study the potential of Microwell scaffolds will be tested as a carrier for the transplantation of islets

of Langerhans for the treatment of type 1 diabetes. Our aim is to study an allogeneic transplantation model in immunodeficient Nude Rowett Rats (to avoid rejection of allogeneic HLA mismatching tissue) using Albino Oxford rats as a donor for islets. It should be mentioned that for allogeneic transplantation the immunodeficient rats (Nude Rowett rats) are required as acceptor. The PUG microwell scaffolds are prepared as a carriers for islets. The scaffold includes microwells (containers) with a diameter of $\sim 300\mu\text{m}$, in which the donor islets can be seeded. It further contains a flat film functioning as a lid to prevent loss of islets. Moreover, both lid and micro wells will allow for revascularization. To assess the potential of the new implant technique we will observe the engraftment and the functionality of the construct, revascularization and survival of islets of Langerhans. The functionality is defined as a controlled and adequate response to a changes in glucose levels in the blood.

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.

Polymers:

- 1) Thin-film microwell array scaffolds comprising 4000PEOT30PBT70 (Polyactive©)
- 2) Thin-film microwell array scaffolds comprising Polyurethane (PUG)

Type of animals:

- 1) Species: Rat strain: Albino oxford rat (normal male rat)
- 2) Species: Rat strain: Rowett nude (immune deficient male rat)

We will calculate the exact number of animals per experiment based on a power calculation. Based on previous and current studies done at the UMCG with islets and scaffolds, we estimate that a group size of 8-12 animals per group will suffice.

The following groups will be used in this project:

- 1- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in albino oxford (AO) rats (n=12).
- 2- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in AO rats (n=12).

3- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).

4- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).

5- Positive control 1: Transplantation of free islets under renal capsule in Rowett nude rat (n=12).

6- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude Rats (n=12).

7- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).

8- Control 2: Transplantation of free islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).

9- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).

10- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).

11- Control 3: Transplantation of free islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).

Detailed explanation of groups.

1- Group 1: Polyurethane (PUG) polymer scaffolds:

One PUG thin-film microwell scaffold per rat will be implanted retroperitoneally in Albino Oxford rats to evaluate local tissue response. This test is for local tissue response and biocompatibility of scaffolds. Retroperitoneal site is considered a proper site for implantation of the scaffolds because of a lesser immune response compared to the subcutaneous site and peritoneal cavity, while having sufficient space to place a scaffold. The surface area of each scaffold comprises of a porous lid and bottom containing microwells and is approximately 2.5 cm in diameter and about 370 μm thick in total. Before microwell fabrication a predefined pattern of pores, each with a diameter of around 30 μm , is created using femto-

second laser drilling to allow for vascularization, resulting in a macroporous implant made of two 20-30 micrometer thick polymer sheets.

2- Group 2: PEOT/PBT (Polyactive) polymer scaffolds:

One PEOT/PBT scaffold per rat will be implanted retroperitoneally in Albino Oxford rats to evaluate local tissue response. This test is for local tissue response and biocompatibility of scaffolds. The retroperitoneal site an interesting site for implantation of scaffolds, because of the decreased foreign body response and the amount of space available in comparison to the subcutaneous site and peritoneum. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1. The reason for testing scaffolds without islets at the retroperitoneal site is that we have ample experience with implantations using these polymers in the other locations used in this study, in rat models, but not at the retroperitoneal site. These two groups serve two important goals namely: 1) gaining experience with the retroperitoneal implantation, and 2) monitoring the tissue response to the scaffolds at this specific location.

3- Group 3: Clinically grade polyurethane (PUG) polymer scaffolds for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted retroperitoneally in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

4- Group 4: PEOT/PBT (polyactive) polymer scaffold for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The Polyactive scaffolds will be implanted retroperitoneally in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

5- Control 1 for islet transplantation:

Diabetes will be induced in the control group. The pancreatic islets will be isolated from Albino Oxford rats, and transplanted under the kidney capsule in Rowett nude rats. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas.

6- Group 6: Clinically grade polyurethane (PUG) polymer scaffolds for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted in the peritoneal cavity of diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets the endocrine volume of the endocrine pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

7- Group 7: PEOT/PBT (polyactive) polymer scaffold for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The Polyactive scaffolds will be implanted in the peritoneal cavity of in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have a similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

8- Control 2 for islet transplantation:

Diabetes will be induced in the control group. The pancreatic islets will be isolated from Albino Oxford rats, and transplanted in the peritoneal cavity of Rowett nude rats. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas.

9- Group 9: Clinically grade polyurethane (PUG) polymer scaffolds for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted subcutaneously in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

10- Group 10: PEOT/PBT (polyactive) polymer scaffold for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PEOT/PBT scaffolds will be implanted subcutaneously in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

11- Control group 3 for islet transplantation:

Diabetes will be induced in the control group. The pancreatic islets will be isolated from Albino Oxford rats, and transplanted subcutaneously in Rowett nude rats without scaffolds. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas.

It should be mentioned that diabetes will be induced in the nude rats by an injection of streptozotocin in the tail vein. The glucose concentration in the blood is determined in special time points with a drop of blood from the tail vein and a glucose meter. If required, a second injection will be given if the blood glucose concentration is not lower than 20 mmol/L. If the blood glucose concentration of the rats has reached critical level an insulin implant will be inserted subcutaneously. The implant (7 mm long, 2 mm diameter) ensures constant release of insulin to alleviate the stress caused by diabetes to the animals. When full type diabetes has been induced the implants will be placed. We will continue monitoring glucose levels for couple of months on a weekly basis. At the end of the implantation period the animals will be sacrificed. All surgeries with the nude rats will be done in a flow cabinet to work as aseptically as possible.

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.

To study the local tissue response and biocompatibility of PUG and polyactive polymers, the scaffolds will be implanted on Albino oxford rats.

In the next step, the scaffolds consist of islets will be implanted in diabetic nude Rowett rats to study the effect of scaffolds on viability and function of islets and restoring long-term normoglycemia in the rats. The islets will be implanted in 3 different sites (renal capsule, peritoneal cavity and subcutaneous) to find the proper site for implantation. Based on previous studies islet transplantation in peritoneal cavity and subcutaneously have proper islet function and viability. we are going to try the implantation of scaffolds containing islets in the same sites as well as renal capsule to find the proper site for implantation.

Milestone and selection points:

The scaffolds will be implanted retroperitoneally in the anesthetized nude diabetic rats. To this end a small incision (4-5 mm) will be made in the kidney area on the back of the rat. The scaffold will be implanted and fixed in the space.

For islet donation, the abdominal cavity of the anesthetized Albino oxford rats will be opened. Then a cannula will be inserted into the bile duct followed by perfusion with a sterile collagenase solution to enable islet isolation. Subsequently, the pancreas will be removed and the islets will be isolated by collagenase and manual selection. After isolation the islets will be counted to determine the yield. Islets will then be kept overnight in culture, and used the next day for seeding into the constructs and transplantation. For every recipient animal one needs 5 donors for seeding of the equivalent of the endocrine volume of the endocrine pancreas.

The isolated islets will be seeded directly into PUG and Polyactive microwell-scaffolds. Subsequently, they will be transferred to the operation room in a sterile manner in a closed container. The islet containing scaffolds will be placed retroperitoneally, while in the control rats, islets will be transplanted under the renal capsule.

Ten days after the islet containing scaffolds were transplanted, the "insulin implant" will be removed to be able to observe the effect of the scaffold on blood glucose levels. Blood glucose concentrations will be measured at day 1, 3, 5, 7, 10 and 14 during 2 weeks, followed by weekly measurements until the end of the project. The animals will be weighted 2 times per week.

Four weeks after islet transplantation, glucose tolerance tests will be performed to determine islet function and glucose sensitivity. The glucose tolerance test will be performed following a fasting period of two hours. For this purpose animals will receive 2 grams of normal rat food dissolved in water to eat. They will be trained to eat at least 70% of the food within 5 minutes. 100 µl of blood will be taken from the tail, 5 minutes before and 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 minutes after feeding. Subsequently, the blood insulin and C-peptide concentrations will be measured in order to observe the graft function.

4 months after islet transplantation, the animals will be sacrificed and the constructs will be removed and processed for histology.

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	Implantation of scaffolds in diabetic rats (receptor groups)
2	Islet isolation from Albino Axford rats (donor group)
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11000
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Twente
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Implantation of scaffolds in diabetic rats (receptor) |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

To study the local tissue response and biocompatibility of PUG and polyactive polymers, the scaffolds will be implanted on Albino oxford rats.

In the next step, the scaffolds containing islets will be implanted in diabetic nude Rowett rats to study the effects of extrahepatic transplantation on viability and function of islets while restoring long-term normoglycemia in the rats. The islets will be implanted in 3 different sites (retroperitoneal, intraperitoneal and subcutaneous) to find the proper site for implantation. Based on previous mouse studies, done with the same scaffold design where it was shown that mice implanted in the epididymal fat pad, we predict that using a similar construct in a larger animal model for a longer time period will give similar results. We foresee a quick revascularization, because of the macroporous nature of the scaffold, fast recovery of type 1 diabetes, and a long-term survival like we found in the mouse studies. In order to study this in a comparative manner, we will use two different polymeric biomaterials, one similar to the material used in the mouse study and another, which is clinically approved for human use, with similar material properties.

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

In this study the potential of Microwell scaffolds will be tested as a carrier for the transplantation of islets of Langerhans for the treatment of type 1 diabetes. Our aim is to study an allogeneic transplantation model in Nude Rowett Rats using Albino Oxford rats as a donor for islets and find a proper location for implantation in the body. In this study, the PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted at three different sites (retroperitoneally, intraperitoneally, subcutaneously) in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs.

In detail, diabetes will be induced in the nude rats by an injection of streptozotocin in the tail vein. The glucose concentration in the blood will be determined every few days with a drop of blood from the tail vein and a glucose meter. If required, a second injection will be given if the blood glucose concentration is not lower than 20 mmol/L. If the blood glucose concentration of the rats has reached critical level an insulin implant will be inserted subcutaneously. The implant (7 mm long, 2 mm diameter) ensures constant release of insulin to alleviate the stress caused by diabetes to the animals. When full type diabetes has been induced the implants will be placed. We will continue monitoring glucose levels for couple of months on a weekly basis. Meanwhile islets will be harvested from donor rats (Appendix 2). Subsequently, the isolated islets will be seeded directly into PUG and Polyactive microwell-scaffolds. Then, they will be transferred to the operation room in a sterile manner in a closed container. The islet containing scaffolds will be placed in retroperitoneal, intraperitoneal and subcutaneous, while in the control rat's islets without scaffold will be transplanted under the renal capsule, intraperitoneally and subcutaneously respectively.

Ten days after the islet containing scaffolds are transplanted, the "insulin implant" will be removed to be able to observe the effect of the scaffold on blood glucose levels. Blood glucose concentrations and weight of animals will be measured regularly. Moreover, after transplantation of scaffolds, glucose tolerance tests will be performed to determine islet function and glucose sensitivity. The glucose tolerance test will be performed following a fasting period of two hours. For this purpose animals will receive 2 grams of normal rat food dissolved in water to eat. They will be trained to eat at least 70% of the food within 5 minutes. 100 µl of blood will be taken from the tail, in different time points after feeding. Subsequently, the blood glucose concentrations will be measured in order to observe the graft function, when necessary the concentration of insulin and c-peptide in these samples can also be verified. Four months after islet transplantation, the animals will be sacrificed and the constructs will be removed and processed for histology.

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

We calculated the exact number of animals per experiment based on a power calculation. Based on previous and current studies at the UMCG with islets and scaffolds, we estimate that a group size of 8-12 animals per group will suffice. Based on their findings, which are in line with literature, we take into consideration that around 2500 to 3000 islets are needed to sufficiently treat diabetes in this rat model. The following groups will be used in this project:

- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in albino oxford (AO) rats (n=12).
- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in AO rats (n=12).
- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).
- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).
- Positive control 1: Transplantation of free islets under renal capsule in Rowett nude rat (n=12).
- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude Rats (n=12).
- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).
- Control 2: Transplantation of free islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).
- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).
- 10-Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).
- 11-Control 3: Transplantation of free islets in in subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).

B. The animals

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

The normal and immune deficient male rats will be purchased from a licensed breeder in the EU. The male rats will be used as the receptor groups because of less variability due to lack of a hormonal cycle. Additionally, the islet isolation in males are higher than female rats. In total, the scaffolds consisting of islets will be transplanted in 72 Rowett nude rats and scaffolds without islets will be implanted in 24 Albino oxford rats, while the control group will consist of 36 Rowett nude rats for three different locations (in renal capsule, in peritoneal cavity and subcutaneous). All in all, 108 Rowett rats and 24 Albino oxford rats are required as the receptor groups.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: the experimental design is based on our previous successful in vivo studies in mice. In elaborate in vitro studies we have optimized the scaffold design tailored for islet transplantation. Islet function and viability was extensively tested in vitro showing that the scaffold supports endocrine function and survival of islets. As a follow up study we performed a short-term implantation study in diabetic mice, to test the therapeutic effect of scaffold-implanted islets. Since it is not possible to mimic type 1 diabetes in vitro, the true test can only be performed in a type 1 diabetic animal model to ensure proper endocrine and physiological conditions.

Specifically, we have previously shown in short-term (30 days) in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds comprising 4000PEOT30PBT70 (Polyactive©) in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type 1 diabetes. The scaffold architecture consists of an array of microwell indentations in a 20 µm thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, ~400 µm in diameter and ~350 µm in depth. We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analysed, the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell (Buitinga et al., PLOS ONE 2013; 8(5):e64772). We are now developing an up-scaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical applications.

Reduction: we designed the experiments with use of the minimal amount of rats that are necessary to show a significant effect using power analysis statistics based on previous studies done in our group and at the UMCG.

Refinement: The experiments will be performed at the UMCG animal facility with the help of colleagues having ample knowledge of and experience with transplantation of islets in diabetic rats. The experiments will be assisted and supervised with the help of skilled technicians and PhD students at the UMCG, to ensure a minimal burden for the animals used. Since regular blood samples will be taken, we aim to use a small catheter in the tail vein to further minimize stress to the animal.

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

Anesthesia will be applied according to SOP. During the removal of the pancreas, the transplantation procedures, the application of the insulin implants, the rats will be exposed to a mixture of isoflurane and air, meaning the rats will be under full anesthesia. Moreover, for pain management a dose of temgesic will be administered to the islets only and the islet-scaffold transplanted rats. Subsequently, the

administration will be repeated after 8-12 h. The total duration of pain relief will be 1-2 days. I should mention that because the blood samples will be collected at short intervals, for decreasing the suffering for animals, we will use of a catheter in the tail vein.

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.

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.

Anaesthesia will be used in receptor groups before transplantation. Moreover, the rats will receive post-islet transplantation pain relief medication.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Induction of type 1 diabetes in rats may lead to loss of weight.

Explain why these effects may emerge.

The physiological effects of not being able to control blood glucose levels because of insufficient insulin production by the animal and/or transplanted islets.

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

The weight of the rats will be regularly monitored and in case a severe weight loss occurs the experiment will be terminated. If necessary the islets volume used in the subsequent experiment will be increased to ensure better glycemetic control.

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.

When animals show signs of disease (curved posture, losing weight more than 20% of the total body weight), they will be sacrificed. However, animals with diabetes can look worse, or lose weight, but this should not be construed as humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely since the model has been optimized in previous studies at the UMCG and no adverse effects were observed using this optimized model.

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, as a result of surgery for implantation purposes and development of diabetes.

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.

Both Oxford AO and nude Rowett rats will be euthanized by cutting the aorta under full anaesthesia after 5.5 months of implantation after which the scaffolds will be explanted and evaluated histologically.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11000	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	University of Twente	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Islet isolation from Albino Oxford rats (donor group)

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this study the potential of Microwell scaffolds will be tested as a carrier for the transplantation of islets of Langerhans for the treatment of type 1 diabetes. Our aim is to study an allogeneic transplantation model in Nude Rowett Rats using Albino Oxford rats as a donor for islets and find a proper location for implantation in the body. Albino Oxford rats will be used as a donor for islets due to the higher islet isolation efficiency .

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

In this part of the study, the islets will be isolated from Albino Oxford rats. In detail, for islet donation, the abdominal cavity of the anesthetized Albino Oxford rats will be opened. Then a cannula will be inserted into the bile duct followed by perfusion with a sterile collagenase solution to enable islet isolation. Subsequently, the pancreas will be removed and the islets will be isolated by collagenase and manual selection. After isolation the islets will be counted to determine the yield. Islets will then be kept overnight in culture, and used the next day for seeding into the constructs and transplantation. For every recipient animal one needs 5 donors for seeding of the equivalent of the endocrine volume of the endocrine pancreas. In total, 540 Albino Oxford rats are required for isolation and transplantation of islets in 108 Rowett nude rats.

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

Since, every recipient animal one needs 5 donors for seeding of the equivalent of the endocrine volume of the endocrine pancreas, In total, 540 Albino Oxford rats are required for isolation and transplantation

of islets in 108 Rowett nude rats.

B. The animals

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

The normal male rats will be purchased from a licensed breeder in the EU. The male rats will be used as the donor group because of the less variable in males due to lack of a cycle. Additionally, the isolation efficacy in males are higher than female rats. Based on experience from previous studies in this animal model, 2 µl of islet tissue can be isolated from an Albino oxford rat. Moreover, 10 µl (2500-3000 islets) of islet tissue is sufficient to induce normoglycemia. So, 5 Albino oxford rats are required as islet donors for transplantation in one diabetic Rowett nude rat. All in all, in total 540 "Albino oxford rats " are required for islet isolation.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: the experimental design is based on our previous successful in vivo studies in mice. In elaborate in vitro studies we have optimized the scaffold design tailored for islet transplantation. Islet function and viability was extensively tested in vitro showing that the scaffold supports endocrine function and survival of islets. As a follow up study we performed a short-term implantation study in diabetic mice, to test the therapeutic effect of scaffold-implanted islets. Since it is not possible to mimic type 1 diabetes in vitro, the true test can only be performed in a type 1 diabetic animal model to ensure proper endocrine and physiological conditions.

Specifically, we have previously shown in short-term (30 days) in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds comprising 4000PEOT30PBT70 (Polyactive©) in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type 1 diabetes. The scaffold architecture consists of an array of microwell indentations in a 20 µm thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, ~400 µm in diameter and ~350 µm in depth. We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analysed, the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell (Buitinga et al., PLOS ONE 2013; 8(5):e64772). We are now developing an up-scaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical applications.

Reduction: we designed the experiments with use of the minimal amount of rats that are necessary to show a significant effect using power analysis statistics based on previous studies done in our group and at the UMCG.

Refinement: The experiments will be performed at the UMCG animal facility with the help of colleagues having ample knowledge of and experience with transplantation of islets in diabetic rats. The experiments will be assisted and supervised with the help of skilled technicians and PhD students at the UMCG, to ensure a minimal burden for the animals used. Since regular blood samples will be taken, we aim to use a small catheter in the tail vein to further minimize stress to the animal.

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

Anaesthesia will be applied according to Standard Operating Procedures of the UMCG. During the

removal of the pancreas the rats will be exposed to a mixture of isoflurane and air, meaning the rats will be under full anaesthesia. Moreover, for pain management a dose of temgesic will be administered.

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.

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.

The pancreases will be removed for islet isolation, under anesthesia by an incision in the abdominal cavity.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

None.

Explain why these effects may emerge.

-

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

-

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.

When animals show signs of disease (curved posture, losing weight more than 20% of the total body weight), they will be sacrificed. However, these symptoms are not expected for the donor animals.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely.

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').

Terminal, as a result of collection of Islands followed by euthanasia under terminal anesthesia.

End of experiment**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The Albino Oxford rats as islet donors will be euthanized by cutting the aorta under full anaesthesia.

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.I.110.014
2. Titel van het project : Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans
3. Titel van de NTS : Poreuze microwelconstructen voor transplantatie van eilandjes van Langerhans

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: 21-05-2015
- ☐ aanvraag compleet:
- ☒ in vergadering besproken: 03-06-2015 en 09-09-2015
- ☒ anderszins behandeld: per mail: 10-12-2015
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 09-06-2015 tot 18-08-2015
15-09-2015 tot 08-12-2015
11-12-2015 tot 04-02-2016
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☒ advies aan CCD: 18-03-2016

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: 09-06-2015
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- Algemeen: De DEC verzoekt u de titel in het Nederlands te schrijven en de spelfouten uit de tekst te verwijderen. Graag aanpassen.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u in de tekst op te nemen wat de mogelijke voordelen van de transplantatie voor de patiënt zijn in vergelijking met insuline spuiten.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u te noemen waar de eilandjes van Langerhans worden geïmplantéerd en duidelijker uit te leggen dat alle eilandjes samen een orgaan vormen dat insuline produceert. Graag aanpassen.
- 3.5, indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Het is niet de bedoeling alle handelingen hier te benoemen. Daarnaast zijn er nog maar vier categorieën van ongerief: terminaal, licht, matig en ernstig. Een zin als: 'de ernst van de dierproeven wordt ingeschat als licht ongerief' of '75% van de dieren ondervindt licht ongerief en 25% van de dieren ernstig ongerief' is voldoende. Graag wijzigen.

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u wat meer wetenschappelijke achtergrond te geven, inclusief referenties.
- 3.1, achtergrond: Het perspectief van de patiënt ontbreekt. De DEC verzoekt u te beschrijven wat de resultaten van dit onderzoek zouden kunnen opleveren voor de patiënten en dat af te zetten tegen de huidige behandelmethode. Door een transplantatie is het wellicht niet meer nodig insuline te spuiten, maar de DEC neemt aan dat ook die getransplanteerde eilandjes worden aangevallen door het immuunsysteem van de patiënt en dat deze dus wel zijn leven lang immuunsuppressieve middelen zal moeten slikken. Heeft dat de voorkeur boven het spuiten van insuline? Zou het in de toekomst bijvoorbeeld mogelijk zijn om uit eigen stamcellen eilandjes te laten groeien en heeft dat dan meerwaarde voor patiënten ten opzichte van het transplanteren van eilandjes van donoren? Graag nader op dit soort voor de hand liggende vragen ingaan.
- 3.2, doel: In plaats van intraperitoneaal zou men ook in de peritoneale holte (omentum) de transplantatie kunnen laten plaatsvinden, die ook zeer goed doorbloed is en goed te bereiken. Bij los in de buikholte plaatsen is de kans op snelle vascularisatie van de scaffold veel kleiner dan bij plaatsen in het omentum. Heeft u dat ook overwogen? Zo ja, waarom heeft u dan toch gekozen voor intraperitoneaal?
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u te noemen dat er een immuundeficiënte rat nodig is als acceptor.

Bijlagen:

- Algemeen: De DEC verzoekt u het aantal bijlagen te reduceren tot twee, namelijk één met betrekking tot donoren en één met betrekking tot de ontvangers. De DEC adviseert u bijlage 2 of 3 in elk geval te verwijderen, omdat deze identiek zijn. Graag herschrijven.

- Algemeen: De DEC verzoekt u in de bijlagen niet het totaal aantal ratten te noemen voor het gehele onderzoek, maar slechts het aantal ratten te noemen dat nodig is voor het in die bijlage beschreven experiment.
- Alle bijlagen, D. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC verzoekt u hier te noemen dat isofluraan met lucht wordt gegeven, in plaats van met zuurstof. Graag aanpassen.

- Datum antwoord: 18-08-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- Algemeen: Handmatig gedaan, de template heeft een zodanige beveiliging dat de spel check optie in Word niet werkt.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: Aangepast extra zinnen toegevoegd die dit omschrijven.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: Aangepast, een meer uitgebreide omschrijving van de plaatsing en werking van het implantaat.
- 3.5, indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Aangepast zoals gevraagd.

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: Meer referenties zijn toegevoegd en een wat uitgebreidere beschrijving van de achtergrond is nu gegeven.
- 3.1, achtergrond: Aangepast en omschreven waarom extrahepatische transplantatie voordelig is tov intra hepatisch, waarom deze therapie een potentieel beter is dan de huidige en het gebruik van andere celtypen, bronnen is nu beschreven.
- 3.2, doel: Dit is een site die met het oog op de toekomstige klinische toepassing gemakkelijk toegankelijk is, we hebben na overleg met transplantatie chirurgen in Leiden in gedachten genomen dat voor humane toepassing er opschaling van het construct nodig is, en dus ruimte om het implantaat te plaatsen, besloten dat een intra- of retroperitoneale interventie, waarschijnlijk het snelst en meest risico-vrij uit te voeren is in de patiënt. Het implantaat zal ook tegen de wand worden geplaatst en niet vrij in de holte, om toch vaat ingroei door de buikwand te laten plaatsvinden.
- 3.4, onderzoeksstrategie: Aangepast in de tekst.

Bijlagen:

- Algemeen: Er zijn nu slechts 2 bijlagen ipv 5, met daarin de donor en ontvanger interventies beschreven.
- Algemeen: Aangepast zoals voorgesteld
- Alle bijlagen, D. Vervanging, vermindering en verfijning: Aangepast zoals gevraagd

- Datum: 15-09-2015

- Strekking van de vragen:

Beide bijlagen:

- B. De Dieren: In beide bijlagen worden nog steeds alle dieren genoemd. Graag aanpassen.

- H. Pijn en pijnbestrijding: Het lijkt erop dat u een ouder (maar in elk geval niet volledig) formulier van de CCD heeft gebruikt. U dient ook nog de aanvullende vraag te beantwoorden: "Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt".

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij de beschrijving van de statistische methoden staat de volgende zin: "Refer to information available from previous studies to underpin the 8-12 animals required per group". Deze zin komt de DEC wat vreemd over. Graag verhelderen.
- B. De dieren: U spreekt hier over donordieren, terwijl het volgens de DEC in deze bijlage gaat over de ontvanger-dieren. Graag verhelderen/wijzigen.

Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: Omdat deze bijlage gaat over de donoren zou het ongerief hier licht moeten zijn. Graag wijzigen.
- L. Wijze van doden: Ook het antwoord op deze vraag moet worden aangepast op de donordieren. Graag alsnog doen.

Niet Technische Samenvatting

- De DEC raadt u ten eerste aan om de NTS nogmaals kritisch door te lezen vanwege de vele spelfouten en grammaticale fouten en ook de titel helderder te formuleren.
- 3.5: De DEC raadt u aan hier te vermelden welk percentage van de dieren licht ongerief ondergaat en wel percentage matig ongerief ondergaat. Gebruik voor het vermelden van het ongerief de juiste termen, namelijk "licht" en "matig".
- Datum antwoord: 08-12-2015
- Strekking van de antwoorden:
- B. De Dieren: Aangepast in de nieuwe bijlagen.
- H. Pijn en pijnbestrijding: Aangevuld met de benodigde informatie

Beide bijlagen:

- B. De Dieren: Aangepast.
- H. Pijn en pijnbestrijding: Beter en uitgebreider omschreven.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Deze zin is inderdaad wat vreemd. We hebben dit nu anders omschreven zodat het duidelijker is hoe deze evaluatie tot stand gekomen is.
- B. De dieren: Gewijzigd

Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: Aangepast.
- L. Wijze van doden: Aangepast.

Niet Technische Samenvatting

- De DEC raadt u ten eerste aan om de NTS nogmaals kritisch door te lezen vanwege de vele spelfouten en grammaticale fouten en ook de titel helderder te formuleren.
Het formulier is niet echt makkelijk om mee te werken, vooral omdat tekst ad random verdwijnt. Maar er zijn sterke verbeteringen gemaakt in de uitleg en ook is er gekeken naar de "typo's".
- 3.5: Aangepast naar bovenstaand advies
- Datum: 11-12-2015
- Strekking van de vraag:
- De DEC heeft uw wijzigingen bekeken en is van mening dat u er verstandig aan doet de voorgestelde veranderingen eerst voor te leggen aan de IvD. De aangedragen wijzigingen zijn naar de mening van de DEC onvoldoende verwerkt in de aanvraag.
- Datum antwoord: 04-02-2016
- Strekking van het antwoord:
- Hierbij stuur ik u de herziene versie van de DEC aanvraag aangepast na overleg met de IVd.

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 doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. De doelstelling van dit project is het optimaliseren van de transplantatie van de eilandjes van Langerhans (insuline producerende cellen) van een donor naar een type I diabetes patiënt. Momenteel injecteren diabetici zichzelf dagelijks meerdere keren met insuline om hun bloedsuikerspiegel op pijl te houden. Echter, deze methode mist een precieze regulatie van de bloedsuikerspiegel. Voornamelijk jonge en ernstige type I diabetes patiënten hebben kans om op de lange termijn ernstige complicaties te ontwikkelen als gevolg van de diabetes, zoals nierfalen, zenuw schade en blindheid. Volgens epidemiologische schattingen zal het aantal type I diabetes patiënten in de toekomst sterk stijgen en zal de behoefte aan een effectievere behandeling toenemen. In het voorliggende project willen de onderzoekers een scaffold testen die als drager voor eilandjes van Langerhans kan fungeren. De eilandjes van Langerhans, omgeven door het scaffold, dienen te fungeren als een nieuw orgaan dat insuline kan afgeven op een natuurlijke wijze. De implantaat wordt in de buikholte geplaatst waarin het wordt omsloten door een netwerk van ingroeïende bloedvaten. Het voordeel van een transplantatie van de eilandjes van Langerhans is een preciezere regulatie van de bloedsuikerspiegel omdat insuline en glucagon afgifte dan continue wordt gereguleerd. Bovendien zullen er dan minder of geen insuline injecties nodig zijn. De transplantatie van eilandjes van Langerhans wordt momenteel al voor de behandeling van diabetespatiënten toegepast. Deze therapievorm is echter nog zeer inefficiënt, doordat het overgrote deel van de getransplanteerde eilandjes van Langerhans afsterft na implantatie. Meerdere donoren zijn nodig om voldoende materiaal te verzamelen voor de transplantatie in één patiënt, en daarom wordt deze behandeling momenteel alleen bij patiënten met een extreme vorm van type I diabetes toegepast. In dit project beoogt men het succes en de efficiëntie van een transplantatie te vergroten door verschillende materialen van het scaffold te testen, het scaffold in verschillende locaties in de buikholte plaatsen en de transplantatietechniek verder te onderzoeken en te toetsen in een groter proefdier (rat in plaats van muis). De opbrengsten hiervan zouden het in de toekomst mogelijk kunnen maken dat slechts één donor nodig is voor één patiënt. Daarnaast zouden de technische ontwikkelingen van het scaffold kunnen bijdragen aan toekomstige methodes waarin stamcellen kunnen worden geïmplantéerd die kunnen fungeren als de eilandjes van Langerhans.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In het onderzoek wordt gebruikt gemaakt van ontvanger ratten (bijlage 1) en donor ratten (bijlage 2). Om te onderzoeken welke parameters van belang zijn voor het verbeteren van de transplantatietechniek willen de onderzoekers a) een tweetal polymeren, b) een drietal locaties in de buikholte, en c) de bloedsuikerspiegel voor een

periode van 4 maanden na transplantatie toetsen in een rat model. Naast de locatie in de buikholte en de locatie subcutaan in de buikholte, is ervoor gekozen om de retroperitoneale locatie voor de transplantatie te onderzoeken omdat in deze locatie wordt verwacht dat de afweer op het donorweefsel minimaal is en de revascularisatie juist optimaal is. Wanneer deze locatie goed werkt, zullen in mogelijke vervolgstudies minder dieren nodig zijn als gevolg van afweerreacties op het donorweefsel. Vier weken na de implantatie van het scaffold met de eilandjes van Langerhans wordt de functionaliteit van de transplantatie getest met behulp van een glucose tolerantie test. Vier maanden na de implantatie van de eilandjes van Langerhans zullen de dieren worden gedood om histologisch onderzoek te doen naar het percentage vitale eilandjes en de revascularisatie van het scaffold. 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. De onderzoeksgroep heeft in een voorgaande studie in muizen onderzoek gedaan naar de transplantietechniek met 1 type polymeer in een tweetal locaties; subcutaan en in de buikholte in muizen. De resultaten hiervan waren positief; de muizen die het scaffold hadden gekregen reageerden goed op de glucose tolerantie test, hadden gedurende de 30 dagen van het experiment een normale bloedsuikerspiegel en histologisch onderzoek wees uit dat er een goede revascularisatie was opgetreden.

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. Het ongerief van de ontvangerdieren wordt ingeschat als matig omdat de inductie van diabetes tot stress en gewichtsverlies kan leiden. Het ongerief van de donordieren wordt ingeschat als terminaal omdat onder terminale anesthesie de eilandjes van Langerhans geïsoleerd zullen worden. Er worden vijf donordieren nodig geacht voor de transplantatie van één ontvangerdier. Daarom zijn 80% van de aangevraagde dieren donor dieren met licht ongerief en 20% van de aangevraagde dieren de ontvangerdieren met matig ongerief. Gezien de ervaringen met dit model in eerdere studies, waarbij geen onverwachte negatieve effecten werden waargenomen, ligt het niet in de lijn der verwachting dat een of meerdere dieren het humane eindpunt zullen bereiken.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De complexe endocriene en fysiologische processen die gepaard gaan met diabetes kunnen niet worden nagebootst in een *in vitro* opstelling of met computermodellen. In voorgaande *in vitro* studies hebben de onderzoekers gewerkt aan het optimaliseren van het design en de functionaliteit van de scaffolds. In voorgaande *in vivo* studies hebben de onderzoekers onderzocht welke poreusheid van het scaffold het beste werkt voor een snellere revascularisatie en de functionaliteit van het scaffold. Deze voorgaande *in vitro* en *in vivo* experimenten zullen de kans op waardevolle resultaten vergroten en onnodig proefdiergebruik voorkomen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Met behulp van een powerberekening is het benodigde aantal dieren vooraf berekend. Men heeft ervoor gekozen immuundeficiënte Nude Rowett ratten in te zetten als ontvangerdieren, zodat voorkomen kan worden dat een afweerreactie optreedt en de geïmplanteerde eilandjes van Langerhans worden afgestoten. Dit zal het aantal benodigde dieren sterk verminderen. De DEC is van mening dat het maximaal aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd van het project.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. De ontvanger ratten die model staat voor type I diabetes zijn de immunodeficiënte Nude Rowett ratten; diabetes kan worden geïnduceerd door een injectie met streptozotocin. De donorratten zijn Albino Oxford ratten. De nieuw te testen retroperiotoneale locatie zal eerst wordt getest in de Albino Oxford ratten, alvorens deze locatie wordt getoetst in de Nude Rowett ratten die diabetes geïnduceerd krijgen. Om ongerief ten gevolge van de chirurgische ingrepen zoveel mogelijk te beperken zullen adequate anesthesie- en analgesieprotocollen worden toegepast. Het ongerief ten gevolge van de geïnduceerde diabetes wordt verlicht door een insuline implantaat in de dieren aan te brengen waarmee een nauwkeurig te reguleren insulineafgifte bewerkstelligt kan worden. Dit insuline implantaat zal tien dagen na transplantatie van de eilandjes van Langerhans verwijderd worden. De bloedsuikerspiegel van de dieren zal gedurende enkele maanden wekelijks in de gaten gemonitord worden. De operaties met de Rowett Nude ratten zullen in een flowcabinet onder aseptisch omstandigheden worden uitgevoerd. Beide polymeren die in deze studie gebruikt zullen worden, worden al gebruikt in klinische studies. Op basis van eerder uitgevoerde *in vitro* en *in vivo* studies is de verwachting dat het ongerief ten gevolge van de geïnduceerde diabetes beperkt zal blijven, omdat revascularisatie van het implantaat en stabilisatie van de bloedsuikerspiegel vrij snel zullen optreden. Wanneer herhaaldelijke bloedafnamen uit de staart noodzakelijk zijn zal een katheter geplaatst worden. De experimenten worden uitgevoerd door onderzoekers die veel ervaring hebben met vergelijkbare experimenten. In dit onderzoek wordt uitsluitend gewerkt met mannelijke dieren. Dit wordt gedaan omdat 1) uit mannelijke

donordieren meer eilandjes van Langerhans verkregen kunnen worden, en 2) om de variatie die veroorzaakt zou worden door de hormonale cyclus van vrouwtjes te vermijden.

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

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende afweging. Het beschreven project heeft als doelstelling de transplantatie van de eilandjes van Langerhans te verbeteren. De uitkomsten van dit onderzoek zullen substantieel bijdragen aan ontwikkelen van een beter scaffold en een optimale transplantatie locatie zodat de transplantatie zo succesvol mogelijk kan verlopen. Daarnaast kan de informatie omtrent de optimale polymeerstructuur van het scaffold en de locatie van dit scaffold in het lichaam worden gebruikt om mogelijk in de toekomst ook lichaamseigen beta-stamcellen te implanteren in type I diabetes patiënten. De DEC is van mening dat het projectvoorstel vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is en dat de vertaling van de onderzoeksresultaten naar de mens mogelijk is. De gestelde doeleinden kunnen worden gehaald binnen de gevraagde termijn. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven diermodellen. De DEC acht, alles overziend, het belang van dit onderzoek daarom substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 80% van de dieren licht ongerief zullen ondervinden (donordieren) en 20% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden (ontvangerdieren). De DEC is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Twente



Postbus 217

7500 AE ENSCHEDE



**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
AVD110002016498

Bijlagen

2

Datum 31 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD110002016498. 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: 11000
Naam instelling of organisatie: Universiteit Twente
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 50130536
Straat en huisnummer: Drienerlolaan 5
Postbus: 217
Postcode en plaats: 7500 AE ENSCHEDE

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: PhD student

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2016
Geplande einddatum: 1 mei 2019
Titel project: Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans
Titel niet-technische samenvatting: Poreuze microwelconstructen voor transplantatie van eilandjes van Langerhans
Naam DEC: DEC-Utrecht
Postadres DEC: [REDACTED] Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
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: Enschede
Datum: 30 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Twente



Postbus 217

7500 AE ENSCHEDE



**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
AVD110002016498

Bijlagen

2

Datum 31 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 31 maart 2016

Vervaldatum: 30 april 2016

Factuurnummer: 16700498

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD110002016498	€ 1.187,00

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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Twente

postbus 217
7500 AE ENSCHEDE

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
AVD110002016498

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 2 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans" met aanvraagnummer AVD110002016498. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 17 mei hebben wij u gevraagd de Niet Technische Samenvatting op een aantal punten te herzien. Op 18 mei 2016 heeft u een herziene versie van de Niet technische Samenvatting ingediend.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 juni 2016 tot en met 1 mei 2019. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

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 18 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. Dit betreft een project waar geen go/no go momenten zijn voorzien en waarvan het niet waarschijnlijk is dat gedurende de looptijd alternatieve methoden worden ontwikkeld of geaccepteerd. De twee algemene voorwaarden worden dan ook niet aan dit project verbonden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Twente
Adres: Postbus 217
Postcode en woonplaats: 7500 AE Enschede
Deelnemersnummer: 11000

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 juni 2016 tot en met 1 mei 2019, voor het project "Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans" met aanvraagnummer AVD110002016498, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistent Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 maart 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 mei 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 18 maart 2016, ontvangen op 30 maart 2016;
 - d. Aanvullingen op uw aanvraag ontvangen op 18 mei 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Implantation of scaffolds in diabetic rats (receptor)	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / 108 Naakte Rowett ratten, 24 Albino oxford controle ratten	132	Matig
Islet isolation from Albino Oxford rats (donor group)	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Albino Oxford ratten	540	Terminaal

Voorwaarden

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

Aan deze vergunning zijn geen voorwaarden gesteld.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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.