

<b>Inventaris Wob-verzoek W17-17</b>		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>			
<b>nr.</b>	<b>Documenten 20171765</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>10.1.c</b>	<b>10.2.e</b>	<b>10.2.g</b>	<b>11.1</b>
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven oud				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek en reactie aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Bijlage dierproeven nieuw				x	x	x	x	
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

1765



23 AUG, 2017

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Academisch Ziekenhuis Leiden</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>27366422</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Albinusdreef   2</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9600</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RC   Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL11DEUT0451001400</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>LUMC</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	27366422	Straat en huisnummer	Albinusdreef   2	Postbus	9600	Postcode en plaats	2300 RC   Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400	Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	27366422																	
Straat en huisnummer	Albinusdreef   2																	
Postbus	9600																	
Postcode en plaats	2300 RC   Leiden																	
IBAN	NL11DEUT0451001400																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																	
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 border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>PhD Student</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Functie	PhD Student	Afdeling	[REDACTED]	Telefoonnummer	[REDACTED]	E-mailadres	[REDACTED]						
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]																	
Functie	PhD Student																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 50%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td style="width: 50%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035,- Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	Leiden
Datum	18 - 7 - 2017
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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Atrial fibrillation (AF) is the most common type of irregular heartbeat. In AF, disorganized electrical signals cause the upper chambers of the heart to contract very fast and irregular. AF commonly progresses from paroxysmal self-terminating to persistent non-self-terminating AF. This suggests that there are different stages of the disease presented with the same

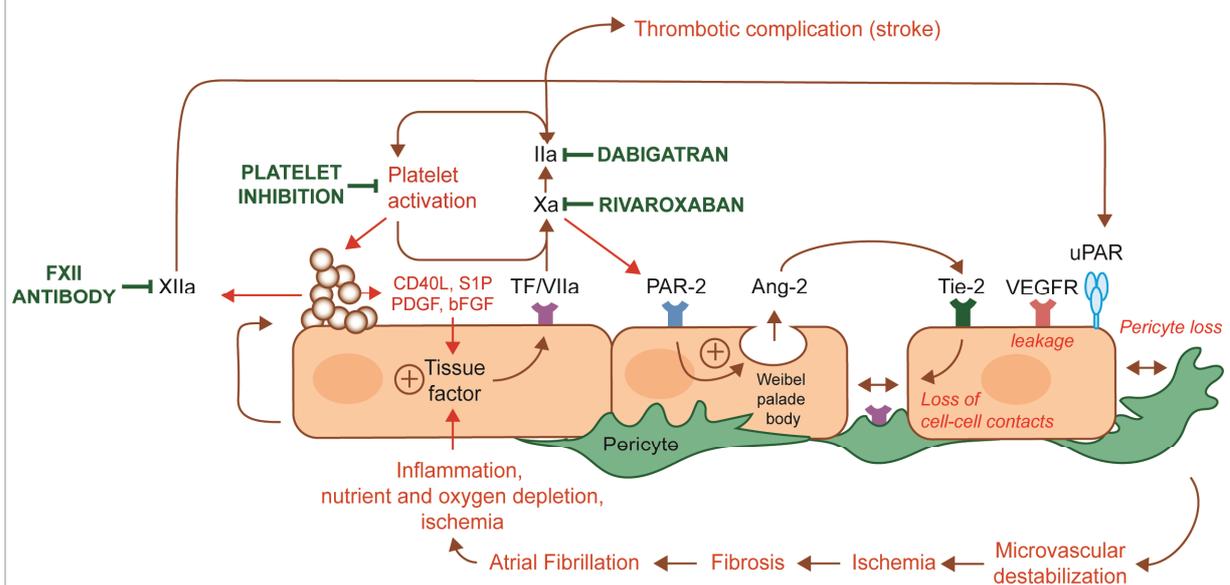
arrhythmia. The persistent form does not return to normal sinus rhythm on its own within 7 days and requires some form of treatment. An electrical shock can be used to 'reset' the heart or heart tissue can be scarred by ablation. AF frequently starts unnoticed, which allows it to progress freely and cause adverse events before it is detected<sup>1</sup>.

Although not benign, AF patients have a five-fold increased risk for stroke compared to those without AF. This is due to a hypercoagulable state in the atria during the fast and irregular contraction. During an AF episode, blood can pool in the atria and form a clot, when the clot breaks free it can enter the bloodstream and cause a stroke. Anticoagulant medication is the first-line treatment used by most of the AF patients. Today the "ideal" anticoagulant treatment is based on direct anticoagulants (DOACs) acting on coagulation factors thrombin (FIIa) and Xa (FXa) with high specificity and efficacy<sup>2</sup>. Besides the risk for stroke, in time, AF patients develop fibrotic scar-tissue in the atrial myocardium that progressively interferes with the normal direction/flow of the electrical wave triggering irregular conduction of the atria. Vice versa, atrial ischemia inflicted by excessive use of ATP and low perfusion during AF further, induces fibrosis, driving the vicious cycle in the progression of AF<sup>3</sup>.

Preliminary data from our █████ █████ █ consortium (Grant awarded by Dutch Heart Foundation) demonstrated a two-fold loss of atrial microvasculature in AF patients compared to patients in normal sinus rhythm. Microvascular rarefaction is measured as the loss of endothelial cell (EC) and pericytes (PC), the main cell types forming the microvasculature<sup>4</sup>.

We hypothesize that atrial fibrillation leads to an ischemia-induced hypercoagulable state of the vasculature, leading to microvascular destabilization/ pericyte loss and eventually fibrosis (Figure 1). Our aim is to confirm our hypothesis and identify optimal anticoagulant treatment to counteract both the risk for stroke and progression of atrial fibrosis.

We will assess our hypothesis and novel potential anticoagulant treatment options in our established mouse model of ischemia reperfusion (I/R) injury of the kidney. A chronic AF mouse model and imaging techniques on the beating mouse heart are not yet developed. The link between microvascular loss and fibrosis has been studied in great detail by our group in the I/R kidney model and, over the years, we learned that this model is ideally suited to quantitatively and qualitatively investigate microvascular rarefaction<sup>6</sup>. While cardiac I/R models have been described and display various aspects of microvascular loss, the lower reproducibility and reduced capabilities for microvascular imaging in future experiments (beating heart vs. immobilized kidney) make our kidney model the model of choice to test our hypothesis. In addition, microvascular loss is also a main driver of chronic kidney disease (CKD) that is the topic of active investigation in our department<sup>7</sup>. The results obtained in this project may be directly translated to benefit our preclinical programs aimed at the development of improved clinical approaches to counteract CKD<sup>8</sup>.



**Figure 1. Hypothesis how AF conditions trigger hyper coagulation and destabilization of the microvasculature.** AF may induce ischemia/ inflammation, through tissue factor (TF) expression on ECs, either directly and/or via platelet activation, subsequently initiating protease activated receptor 2 (PAR-2) activation via the coagulation cascade leading to microvascular destabilisation, which will eventually lead to activation of pro-fibrotic pathways. Angiopoietins regulate microvessel integrity via binding to the endothelial Tie-2 tyrosine kinase receptor. Angiopoietin-1 (Ang1), produced by pericytes, supports endothelial stabilization, while Ang-2, produced by activated ECs, promotes pathological angiogenesis, vascular permeability and inflammation. PAR-2 has been reported to participate in EC integrity by activating the major proangiogenic genes Tie-2/Ang2<sup>4&9</sup>. PAR-2 can be activated by the coagulation proteases Factor VIIa (FVIIa) and Factor Xa (FXa). These proteases function upstream of thrombin (IIa) in the coagulation cascade and are known to trigger TF-dependent thrombin generation and blood coagulation<sup>10</sup>. Dabigatran is a direct inhibitor of thrombin, whereas Rivaroxaban inhibits thrombin indirectly via the inhibition of its upstream protease FXa. Thus, we predict that Rivaroxaban treatment protects against microvascular destabilization and the formation of fibrosis, compared to Dabigatran treatment. Recently, platelets have been shown to activate FXII, which makes platelets even more potent in generating thrombin<sup>11</sup>. In vitro, we have shown that primed ECs activate blood platelets, which mediate a switch of TF-protein into its coagulant-active form. Once ECs and platelets trigger the formation of thrombin, the EC-monolayer is disrupted, leading to exposure of pericyte-derived TF, which will even further potentiate activation of coagulation. Therefore, we hypothesize that inhibition of platelet activity in combination with Rivaroxaban may augment protection against vascular destabilization and fibrosis in an I/R model.

#### References

- 1) Burstein B, Nattel S. Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical Relevance in Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology* 2008. 51 (8) pp: 802-809.
- 2) Kumar et al., Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants and Antiplatelet Therapy for Stroke Prevention in Patients With Atrial Fibrillation. *Cardiol Rev.* 2016. 24: 218-23.
- 3) Schotten U, Verheule S, Kirchhof P and Goette A. Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal. *Physiol Rev* 2011. 91: 265-325.
- 4) Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen VM, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K, Saharinen P. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin  $\beta$ 1 activation. *Nat Commun.* 2015 Jan 30;6:5962.

Kamphuisen, Hugo ten Cate, Harry J. Crijns, Isabelle C. Van Gelder, Anton Jan van Zonneveld, Ulrich Schotten,

[REDACTED]

8) David D. McManus, Jane S. Saczynski, Jeanine A. Ward, Khushleen Jaggi , Peter Bourrell, Chad Darling, Robert J. Goldberg. The Relationship Between Atrial Fibrillation and Chronic Kidney Disease : Epidemiologic and Pathophysiologic Considerations for a Dual Epidemic. JAFIB. 2012 Vol 5. Issue1.

9) Zhu T1, Sennlaub F, Beauchamp MH, Fan L, Joyal JS, Checchin D, Nim S, Lachapelle P, Sirinyan M, Hou X, Bossolasco M, Rivard GE, Heveker N, Chemtob S. Proangiogenic effects of protease-activated receptor 2 are tumor necrosis factor-alpha and consecutively Tie2 dependent. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Apr;26(4):744-50.

10) Camerer E1, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 9;97(10):5255-60.

11) Joanne L. Mitchell, Ausra S. Lionikiene, Georgi Georgiev, Anja Klemmer, Chelsea Brain, Paul Y. Kim and Nicola J Mutch. Polyphosphate co-localizes with factor XII on platelet-bound fibrin and augments its plasminogen activator activity. Blood 2016 :blood-2015-10-673285.

### 3.2 Purpose

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

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

The main objective of the current project is to study the components that lead to hypercoagulability and the effect of anticoagulant interventions and/or platelet inhibition on vascular remodelling in a kidney I/R injury model. The role of coagulation in AF is recently shown by our [REDACTED] consortium and others, however the mechanism behind coagulation-induced fibrosis is not yet clarified. We propose that ischemia triggers hypercoagulation leading to microvascular destabilization and eventually fibrosis. We want to show the effect of coagulation on ischemia-induced microvascular loss using DOACs. [REDACTED]

[REDACTED]

The following research questions will be addressed, based on the most effective DOACs, platelet inhibitor or biological inhibitor (antibody) at the time of experiment:

- 1) Does FXa (Rivaroxaban) inhibition attenuate IRI-induced microvascular loss/ fibrosis?
- 2) Is the use of a FXa-inhibitor (Rivaroxaban) more efficient in preventing IRI-induced microvascular loss/fibrosis than a FIIa-inhibitor (Dabigatran)?
- 3) Will FXa (Rivaroxaban) inhibition in combination with platelet inhibition attenuate IRI-induced microvascular loss/ fibrosis more potent than FXa (Rivaroxaban) inhibition alone?
- 4) Does FXII inhibition (antibody) attenuate IRI-induced microvascular loss/fibrosis?

5) What is the role of role of coagulation on microvascular rarefaction measured by EC/ PC loss during ischemia?

### 3.3 Relevance

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

European populations are ageing rapidly. Eurostat, the European statistics' office, reported that almost 30% of the total EU population was 55 years or older in 2010. This number is expected to rise to just over 40% by 2060. This large group of elderly people has important public health consequences, including an increasing number surviving with AF, with a related increase in their use of health care services. AF is an age-related disease and the most common sustained arrhythmia in the population. It is shown that AF progression is associated with a significant disease burden, including increased cardiovascular hospitalisation and mortality due to heart failure, stroke, or myocardial infarction. The costs of AF diagnostics and treatments are becoming a huge burden, especially due to in-patient care and it is predicted that they will rise sharply in the next decades, due to the fact that AF is a progressive disease, with progression of both the arrhythmia and the underlying cardiovascular disease.

Similar to the epidemiology of AF, the incidence of CKD underlies the same risk factors and increases with advancing age. In time, CKD progresses to end-stage renal disease (ESRD) with irreversible renal fibrosis as underlying process, which negatively affects the quality of life and life span of millions worldwide. The costs to manage CKD are high due to its progression to ESRD.

Our proposal is innovative in that it is incorporated in a bigger project collaborating with both experimental- and clinical disciplines [REDACTED]. This contributes to a truly translational proposal because it adopts an approach that moves from cellular- and animal research to the clinic. We expect our approach to change the clinical anticoagulant therapy approach towards patients with AF specifically and ischemic disease in general. Up to now there are no clinical studies comparing the effect of DOAC treatment on atrial remodelling in AF patients. Moreover, our work will provide leads for new upstream therapies directed at the hypoxic/ hypercoagulable state and its consequences. We envisage that our work will form the basis for the development of novel molecular treatments for AF patients and for the prevention of its progression and complications.

### 3.4 Research strategy

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

In a kidney I/R mouse model we will interfere with the coagulation cascade using inhibitors that act on different levels of the cascade. Specifically, we will inhibit thrombin or the coagulation factors leading to thrombin generation (i.e. FXa, FXIIa and/or platelets) and measure the effect on microvascular loss and fibrosis. These experiments will be carried out in a transgenic mouse strain that expresses green-fluorescent protein (GFP) under the TIE-2 promotor to trace the ECs and Tomato-red fluorescent protein (RFP) under the NG2-promotor to trace PCs. With this transgenic mouse strain we can elucidate the role of coagulation on microvascular cell fate (Figure 2).

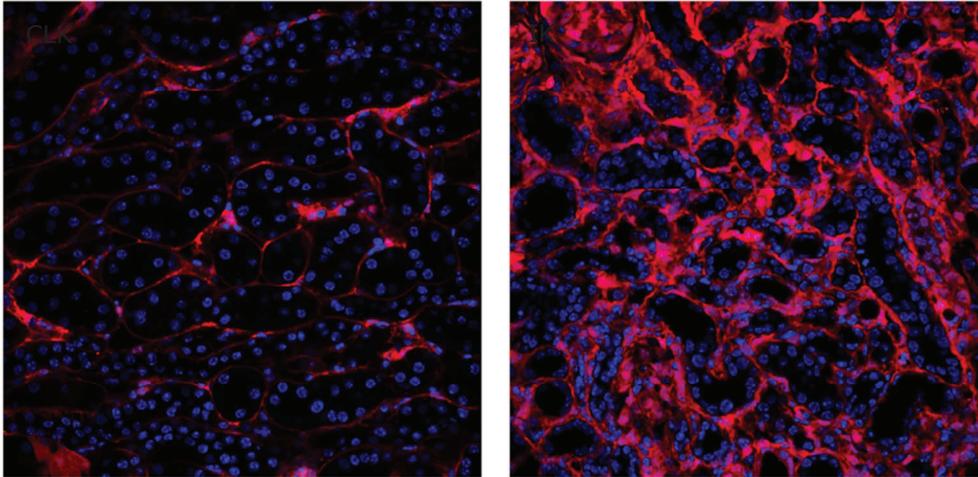


Figure 2. Mouse tomato-red expressed pericytes in the contralateral (CLK) and ischemic kidney (IK) at day 10. Pericytes are the major source of scar-producing myofibroblasts following kidney injury.

The effect of anticoagulants on I/R injury / rarefaction and fibrosis will be studied using the following ex-vivo parameters:

- 1)ECs and PCs will be quantified to determine microvascular loss. [IHC]
- 2)Fibrosis will be measured using Sirius red staining of tissue sections. [IHC]
- 3) The extent of kidney-injury will be quantified by staining of tissue sections for the kidney-injury-marker (KIM-1). [IHC]
- 4) Microvascular leakage will be visualized using a tracing protocol in which albumin that has leaked to extravascular spaces is stained with Evans Blue (Boor et al., 2015). [IHC]

IHC= Immunohistochemistry

---

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.

---

The following components will be part of this project:

- 1)Test the combination of IHC staining in Evans blue stained kidneys from a previously performed I/R study for leakage. When possible we will combine these two read-out methods in the kidney to reduce the amount of mice to test our hypothesis.
  - 2)Perform a pilot experiment of kidney I/R in our transgenic mouse strain (that expresses the GFP under the TIE-2 promotor to trace the ECs and the RFP under the NG2-promotor to trace PCs) to test the sensitivity of this mouse strain on ischemia and reperfusion to perform our main experiment with significant I/R time points to test our hypothesis.
  - 3)Perform the main experiment in kidney I/R injury with the combination of anticoagulant treatment in mice to assess microvascular loss, leakage and fibrosis in this model.
-

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.

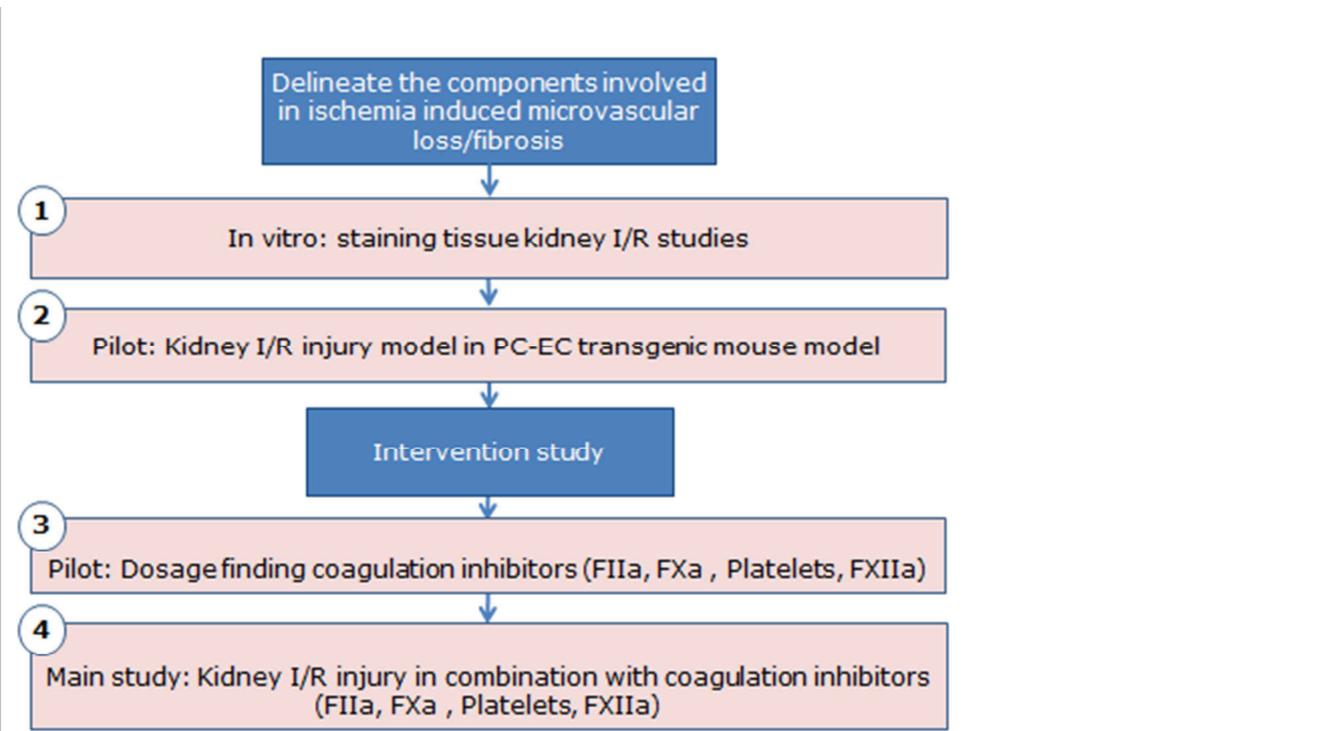


Figure 3: Outline of research strategy

1) First we will test the combination of IHC staining on Evans blue stained kidneys from a previously performed I/R study for leakage. When possible we will combine these two read out methods in the kidney to reduce the amount of mice to test our hypothesis.

Milestone 1a: The combination of IHC and Evans blue staining in kidney tissue is appropriate to combine the read outs in the same animal.

Go/ no-Go moment: We will include an animal group in the main experiment when IHC and Evans blue staining could not be combined on the same tissue.

2) Second, we will start the pilot I/R study to establish the appropriate duration of ischemia for induction of microvascular rarefaction in our transgenic (TIE2/NG2) mouse strain. The TIE2/NG2 mouse-strain has a different background than the mice in which previous kidney I/R injury was studied in (DEC: 13037 LUMC), therefore we are uncertain if they will show a similar sensitivity to ischemia.

Milestone 1b: Define the appropriate ischemia time leading to IRI-induced kidney microvascular rarefaction in our transgenic mouse strain.

Go/ no-Go moment: If the selected ischemia time points do not induce microvascular rarefaction in our transgenic mouse strain, we will have to repeat the experiment with other ischemia times. If the second time points do not show microvascular rarefaction, which will be

very unlikely based on experience, we will not continue.

3) Next we will start the pilot for dosage finding in the TIE2/NG2 transgenic mouse strain. The protocol for dosage finding is obtained from our collaborators in Maastricht (DEC: 2003-179, 2005-121, 2006-082 MUMC). We will collect blood from the mice to confirm that the dosages show the same degree of inhibition of the target activity. For Dabigatran we will perform a prothrombin time (PT), for FXII inhibition an activated partial thromboplastin time (APTT), for Rivaroxaban a FXa-activity assay (Spectrozyme Xa) and for platelet inhibition we will perform a platelet aggregation assay.

Milestone 1: The experimental dosages of anticoagulants and the antiplatelet drug represent therapeutic plasma levels in the TIE2/NG2 transgenic mouse strain.

4) Finally, we will perform the DOAC intervention in the kidney IRI model in the TIE2/NG2 transgenic mouse strain with the appropriate I/R time and read out groups.

Milestone 1: The intervention study confirms our hypothesis that specific anticoagulant therapies attenuate the loss of microvessels after I/R in the kidney.

Taken together, the kidney I/R model will form the basis to elucidate how hypercoagulability affects the integrity of the microvasculature.

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	Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De rol van stolling op het verlies van microvasculaire bloedvatjes
1.2 Looptijd van het project	Jun 2017- Jun 2021
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	stolling, microvasculaire bloedvatjes, fibrose, boezemfibrilleren, nierfalen

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Boezemfibrilleren is één van de meest voorkomende hartritmestoornissen. Ten tijde van boezemfibrillatie is de doorbloeding van het hart verstoord wat kan leiden tot stolsels in het hart, wanneer die doorschieten en de bloedtoevoer van de hersenen blokkeren ontstaat er een herseninfarct. Daarom worden vaak antistollingsmiddelen voorgeschreven.</p> <p>Boezemfibrillatie is niet direct levensbedreigend maar over de jaren verergerd de ziekte en wordt deze steeds moeilijker te behandelen. Het progressieve verloop van de ziekte ontstaat door litteken-vorming van de boezems, de boezems worden fibrotisch. Het fibrotische weefsel kan het fibrilleren opwekken en het fibrilleren leidt weer tot meer fibrose. Ons doel is om te begrijpen hoe de verlittekening van de boezems ontstaat en hoe deze tegen te gaan.</p>
---	--

Data van hartweefsel laat een vermindering van het aantal microvasculaire vaatjes zien in patiënten met boezemfibrillatie vergeleken met patiënten met een normaal ritme. Boezemfibrilleren verstoort de bloedstroom door de vaatjes terwijl het hart veel energie verbruikt waardoor een tekort aan zuurstof ontstaat. Onze hypothese is dat zuurstoftekort de stolling activeert en leidt tot verlies van de vaatjes.

Verlies van de microvasculatuur is op onze afdeling tot in detail in kaart gebracht in een model waarbij de nier tijdelijk wordt afgesloten van zuurstof. Op dit moment is er geen bestaand model voor chronische boezemfibrillatie maar kunnen wij gebruik maken van onze expertise op het gebied van microvasculair verlies in de nier. Wij willen nu dit model gebruiken om het effect van antistollingsremmers op microvasculair verlies in kaart te brengen. Dit onderzoek kan inzicht en richting geven aan een antistolling strategie dat bij boezemfibrillatie zowel de kans op een herseninfarct als verlittekening van het hart op lange termijn tegen kan gaan.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Maatschappelijk belang:

Het littekenweefsel dat ontstaat bij boezemfibrillatie verstoort de geleiding wat leidt tot ritmestoornis en vice versa fibrillatie leidt tot littekenweefsel vorming, waardoor de ziekte progressief kan verlopen. Het tegengaan van dit verloop met specifieke antistolling voorkomt het progressieve verloop van de ziekte.

Wetenschappelijk belang:

Dit onderzoek geeft inzicht op de rol van de stollingsfactoren op stabiliteit van de microvasculaire bloedvatjes.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor het onderzoek gebruiken we muizen. In dit onderzoek ligt de nadruk op de rol van de specifieke stolling remmers (gebruikt in de kliniek) die potentieel kunnen beschermen tegen het verlies van de microvasculaire vaatjes en het ontstaan van fibrose. In totaal zijn er maximaal 490 muizen voor de studie nodig.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Alle procedures worden uitgevoerd onder narcose. Als gevolg van de procedure waar lokaal de doorbloeding naar de nier wordt geremd en weer vrijgegeven kan ongerief ontstaan.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig ongerief: (100%)

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De muizen worden gedood, waarna de organen uitgebreid geanalyseerd worden.

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom

Voordat het besluit wordt genomen om een dierstudie uit te voeren wordt eerst gekeken of er alternatieve manieren zijn om de onderzoeksvraag te beantwoorden. De ontwikkeling van microvasculair verlies is zeer complex waarbij onder andere zowel de structuur van de nier als de bloedcirculatie betrokken is en meerdere celtypen een rol spelen. We kunnen deze reacties

proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

momenteel nog niet nabootsen in iets anders dan een levend organisme.

#### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Vermindering vindt plaats door op een doordachte wijze de proef te ontwerpen zodat er zo min mogelijk dieren per groep nodig zijn. Dit doen we door een goede statistische onderbouwing van de studies te maken en gebruik te maken van jarenlange ervaring van de wetenschappers. Door een pilot studie te doen kunnen we een goede keuze maken voor de beste ischemie-reperfusie tijd, wat bijdraagt om met zo min mogelijk dieren een significant verschil te kunnen waarnemen. Daarnaast maken wij gebruik van de contralaterale nier als niet-behandelde controle. Hierdoor hebben wij geen extra controle groep nodig.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De muis wordt gebruikt om de rol van de stollingsfactoren bij de ontwikkeling van microvasculair vaatverlies en fibrose te begrijpen en in detail te kunnen uitwerken. De muis is een zeer geschikt model omdat er veel bekend is over de biologische processen van de muis, ze veel overeenkomsten hebben met die van de mens, en er zeer geschikte technieken aanwezig zijn om microvasculair vaatverlies te kunnen bestuderen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Bij ongerief krijgen de proefdieren altijd adequate verdoving en pijnstilling.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 1             | Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model. |
- 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.

The well-established model of ischemia reperfusion (I/R) injury in the kidney will be used to determine the effect of the coagulation pathway in the process of microvascular rarefaction and leakage. The direct anti-coagulants (DOACs), dabigatran and rivaroxaban, platelet inhibitor and the FXII-inhibitor (antibody) are known to act on different levels of the coagulation cascade. Using these different agents in combination with the IRI model, makes it a highly suitable model to elucidate the role of the coagulation cascade on microvascular rarefaction.

We will include different animal groups related to the following read outs:

- 1) ECs and PCs will be quantified to determine microvascular loss. [IHC]
- 2) Fibrosis and the extent of kidney-injury will be quantified by staining of tissue sections with Sirius red and the kidney-injury-marker (KIM-1) respectively. [IHC]
- 3) Microvascular leakage will be visualized using a tracing protocol in which albumin that has leaked into extravascular spaces is stained with Evans Blue. [IHC]

Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, where we combine Evans Blue with IHC staining, we might combine read out 2 and 3 to lower the amount of animal groups when possible.

We would like to implement the following experimental setup:

Pilot groups:

1) To define the sensitivity of the project related transgenic mouse strains like TIE2/NG2 for I/R- induced microvascular loss and fibrosis, different ischemia- and reperfusion times will be tested. This pilot study will be used to choose the best I/R time for the other experiments in this Appendix. The mice will be sacrificed at day 2 (n=3) and day 14 (n=3), based on experience these time points are most relevant to study microvascular loss and fibrosis respectively. We will use maximal 3 different ischemic time points in combination with 2 different reperfusion time points, a total of 6 groups, when the first 2 ischemia time points are not informative enough.

Group	Ischemia time	Reperfusion time	Read out
1	30 min	2 days	IHC
2	30 min	14 days	IHC
3	45 min	2 days	IHC
4	45 min	14 days	IHC

2) In this group, peripheral blood samples will be used for analysis of efficacy of treatment with Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor or FXII-inhibitor. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

Group	Drug	Activity assay
1	Rivaroxaban	FXa chromogenic substrate
2	Dabigatran	PT
3	Platelet inhibitor	Aggregation assay
4	Antibody FXII	aPTT

Main experiment:

Treatment groups based on unilateral I/R kidney injury:

- 1) placebo +IRI
- 2) Dabigatran +IRI
- 3) Rivaroxaban +IR
- 4) Platelet inhibitor +IRI
- 5) Rivaroxaban + Platelet inhibitor +IRI
- 6) FXIIa inhibitor + IRI
- 7) Isotype antibody

This classification will be used for every procedure, including the types of read out and reperfusion time.

Procedure	Model	Reperfusion time	Read out
1	IRI	15 min	Evans Blue (IHC*)
2	IRI	Day 2	Evans Blue (IHC*)
3	IRI	Day 14	Evans Blue (IHC*)

\*Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, we decide to combine Evans Blue and IHC staining unless the staining on pre-existing tissue slides could not be combined.

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

The following transgenic mouse strain will be used:

A transgenic mouse strain that expresses green-fluorescent protein (GFP) under the TIE-2 promotor to trace the ECs and Tomato-red fluorescent protein (RFP) under the NG2-promotor to trace pericytes.

Eight weeks old male mice will receive peri-operative analgesia after which unilateral renal IRI will be induced. This will be achieved by a midline laparotomy approach for the surgery with one incision allowing clamping of the renal pedicle to induce ischaemia of the kidney for 30 or 45 minutes, following reperfusion\*. After verification of kidney colour to change back to red, the mice will be closed and adequate pain killing will be applied for 48 hr. Mice will be killed by terminal anaesthesia or under isoflurane anaesthesia receiving an i.v injection with 50 ul 1% Evans Blue solution in PBS, 20 min before the end of the perfusion time. In the Evans Blue group, 0.5 ml blood will be collected via a heart puncture and the animals will be bled via the right atrium and perfused with PBS via the left ventricle of the heart. Evans blue will be quantified in the blood and kidney of the mice. In all groups both kidneys will be excised, one as control and the other to examine Evans Blue- or protein staining\*.

We will administer the following drugs in the intervention protocol: Dabigatran (anti-FIIa), Rivaroxaban (anti-FXa), platelet inhibitor, Rivaroxaban + platelet inhibitor, anti-FXIIa antibody, placebo or an isotype antibody. The drugs will be administered intravenously via vena jugularis 5 min after induction of ischemia in a 100 µl volume. After 15 min of reperfusion, the drugs will be applied a second time in the same way and dosages compared

to the first administration. Our collaborators in Maastricht found from older experiments that coagulation inhibitors showed a protective effect on the inflammatory responses after IRI with the highest effectiveness when administering the anticoagulants during the ischemic- and reperfusion period.

At 15 min and at day 2 and day 14 after kidney IRI, the mice will be sacrificed with terminal anaesthesia and bled after which tissue will be collected. The group of mice used for Evans Blue staining will be bled via a heart puncture.

\*dependent on the outcome described in Figure 3.

---

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

---

Vascular IRI pilot group:

Based on LUMC DEC 13037: For the pilot group we will use 3 animals per group to make a decision on the best IRI-time. This is necessary to establish the minimal relevant difference by IRI with the least amount of mice for the intervention study.

Drug-dosage pilot group:

Based on MUMC 2014-036: Medication will be administered intravenously via the vena jugularis in a 100 µl volume (Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor and FXII-antibody) under anaesthesia and medication will be applied a second time 50 min after the first administration. After 30 min the mice will be killed and bled. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

Drug-intervention study:

Student's t-test results with a confidence interval of 5% ( $\alpha=0.05$ ), and power capacity of 80% ( $\pi=0.8$ ):  $Z_{\alpha/2} - Z_{\pi} = (n/2)^{1/2} * (\mu_1 - \mu_2) / \sigma$

Based on MUMC 2014-036: variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in reduction of rarefaction or in immunohistochemistry and protein parameters through administration of Dabigatran or Rivaroxaban, 9 animals are required for each group.

Microvascular leakage group:

Student's t-test results with a confidence interval of 5% ( $\alpha=0.05$ ), and power capacity of 80% ( $\pi=0.8$ ):  $Z_{\alpha/2} - Z_{\pi} = (n/2)^{1/2} * (\mu_1 - \mu_2) / \sigma$

Based on LUMC DEC 13037: the variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in microvascular leakage with a power of 0,8 and a P-value of 0,05%, 9 animals are required for each group.

Based on previous experiments, we expect a loss of 10% in animals (during experiments and tissue workup), therefore we would ask for 10 animals per read out-group.

---

---

**B. The animals**

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

Species: TIE2/NG2 male mix C57BL6/Agouti and FVB/N background at age of 8-12 weeks, breeding facilities of the LUMC.

Based on (a) the knowledge that male mice are more sensitive to kidney (IRI), (b) the female procedure of IRI is complex because the arteries of the ovary are in close proximity with the renal arteries and (c) based on experience from previous research we prefer male mice in our experiment.

Dependent on the outcome described in Figure 3-2 we select either 1 or 2 read out groups, calculation 1 or 2 will follow:

1) Unilateral + 2 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add maximal 2 groups extra is 18 animals.

Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.

Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 1x read out (Evans blue / IHC) , is 210 animals.

Total: 252 animals, maximal 280 animals.

2) Unilateral + 3 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add 3 animals if fibrosis is not confirmed at day 14 (2x) is 18 animals.

Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.

Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 2x read out (Evans blue / IHC) , is 420 animals.

Total: 462 animals, maximal 490 animals.

---

**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 most significant task in this project is to obtain information of drug intervention at the stage of ischemia and reperfusion and their effect on microvascular rarefaction and leakage in vivo. At the moment we are working on new in vitro technologies to grow and visualize microvessels on a chip as a possible alternative for in vivo studies.

However, the effects on microvascular rarefaction in the kidney are complex and at this

---

moment the chip model is not yet compatible with the same physiological conditions. We want to look at microvascular rarefaction which is a process of ECs-PCs destabilisation and at this moment the chip contains solely ECs. Also, our proposed experiments cannot be performed in patients, since renal tissue is needed to examine the direct effect of drug administration on IRI microvascular rarefaction. Therefore, there is no alternative method. With regard to the selection for a murine model, we already performed these experiments – IRI in the kidney – in the mouse and could establish good techniques and interpretable results.

#### Reduction

The IRI operation will be performed by highly skilled and experienced staff, which will reduce intra-experimental variation and as such will result in fewer animals that will be needed per experiment to obtain reliable and statistically significant data. Furthermore we include in vitro and in vivo pilot studies in our proposal to delineate the number of animals needed for our research questions as precise as possible. Dependent on the outcome described in Figure 3 we might be able to reduce the number of animals in this project, by using the contralateral kidney as control and combine read out groups to obtain significant data.

#### Refinement

IRI surgery and drug administration will be performed under isoflurane anaesthesia. Pre- and post-operative analgesia will be administered to reduce the pain. If any of the animals develop any state described as humane endpoint, the animals will be humanely sacrificed, with an appropriate pentobarbital dose. Finally, experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. After surgery we provide the animals with solid and liquid chow in case they have difficulties chewing.

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

Animal suffering will be minimised where possible through the use of adequate anaesthesia and pain reduction. Any procedures will be carried out under complete anaesthesia. Following the procedures the animals will be receive adequate pain relief in order to decrease animal suffering as much as possible. The study is not expected to cause any adverse effects on the environment.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

n.v.t.

## 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 and perioperative analgesia will be applied in all experiments.

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

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

The known adverse effect are drowsiness due to the analgesia after I/R kidney injury operation. Overall the animals behave normal after the surgery.

Explain why these effects may emerge.

Analgesia effect.

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

Accurate peri-analgesia anaesthesia administration will be performed by highly skilled and experienced staff.

### **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.

- In case of complications during or after surgery, direct euthanasia will be performed.
- Euthanasia will be performed on all animals suffering from disease or pain despite analgesia (within the experimental procedure or after the preparative surgery). Qualified staff and the project applicant will judge whether animals suffer from pain, based on experience and common sense. The experienced employees of the animal facility will also judge discomfort.
- We will set up a list to score and judge the severity of the following signs: Weakness, fur and nutritional problems, signs of infection (round back, non-movement, shaky).

- Animals will be removed from the experiments when they suffer from weight loss 15% of their body weight in 1-2 days.
- When the operation wound gets infected and lead to suffering or when the animals hurts itself euthanasia will be induced.

Indicate the likely incidence.

Based on experience with previous experiments the incidence is expected to be very low.

#### **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').

i.v injection drug under anaesthesia: mild

IRI under anaesthesia: Moderate; animals have to recover from anaesthesia.

Overall discomfort: 'moderate'

### **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.

To analyse microvascular rarefaction using FACs sorted ECs and PCs, to stain for fibrosis in the kidney and to quantify leakage using Evans blue protocol mice need to be sacrificed.

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

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

Yes

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1160020171765
2. Titel van het project: The role of the coagulation system on microvascular rarefaction.
3. Titel van de NTS: De rol van stolling op het verlies van microvasculaire bloedvaatjes.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: DEC Leiden
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 01-06-2017
  - aanvraag compleet: 01-06-2017
  - in vergadering besproken: 15-06-2017 & 06-07-2017
  - anderszins behandeld: via emailronde
  - termijnonderbreking(en) 20-06-2017 t/m 28-06-2017 & 07-07-2017 t/m 08-07-2017.
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 28-06-2017 & 08-07-2017
  - advies aan CCD: 08-07-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager  
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 20-06-2017
  - Strekking van de gestelde vragen:  
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de go/no-go momenten, vervanging, wettelijk vereist onderzoek en de bevoegdheid van het betrokken personeel.
  - Datum: 07-07-2017
  - Strekking van de gestelde vraag:  
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de begrenzing van de beschreven experimenten.
  - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)  
N.v.t.

## **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 over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is duidelijk uitgewerkt. De verschillende subdoelen zijn uitkomstafhankelijk van elkaar en vormen een eenheid. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

### *Belangen en waarden.*

4. Het directe doel van dit project is het bestuderen van componenten die leiden tot hypercoagulabiliteit en het effect van antistollings interventies en/of de remming van bloedplaatjes op vasculaire remodelling in een nier ischemie/reperfusie letsel model. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe moleculaire behandelingen voor patiënten met atriale fibrillatie (AF) en het voorkomen van de progressie en complicaties hiervan. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. De rol van coagulatie in atriale fibrillatie is onlangs in eerder onderzoek aangetoond, echter is het mechanisme achter coagulatie geïnduceerde fibrose nog niet bekend. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het identificeren van de optimale antistollingsbehandeling om zowel het risico op beroerte als de progressie van atriale fibrose tegen te gaan zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënt en diens naasten.  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden.  
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen

inzicht verkrijgen in de rol van antistollingsfactoren op de stabiliteit van microvasculaire bloedplaatjes. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Het littekenweefsel dat ontstaat bij AF verstoort de geleiding wat leidt tot ritmestoornis en vice versa leidt fibrillatie tot littekenweefsel vorming, waardoor de ziekte progressief kan verlopen. Het tegengaan van dit verloop met specifieke antistolling voorkomt het progressieve verloop van de ziekte.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep in samenwerking met nationale onderzoeksgroepen, allen met een erkende expertise. De onderzoeksgroep heeft veel onderzoek gedaan naar de link tussen het verlies van microvasculatuur en fibrose. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot het muismodel voor ischemie reperfusie letsel van de nier. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Daarnaast zijn er belangrijke subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

*Welzijn dieren*

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van het plaatsen van de osmotische minipomp, de immunisaties en de ontstekingen in het zenuwstelsel, inclusief de progressieve motorische problemen of periodieke verlammingen die hierdoor ontstaan, cumulatief maximaal matig ongerief zullen ervaren. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal er een eenzijdige nier-IRI geïnduceerd worden. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Een chronisch AF muis model en imaging technieken op het kloppende hart van een muis zijn nog niet ontwikkeld. Ondanks dat er wel cardiale I/R modellen zijn die verschillende aspecten van het verlies van microvasculaire weergeven hebben deze modellen een lagere reproduceerbaarheid en minder mogelijkheden voor microvasculaire beeldvorming dan het niermodel. Er wordt op dit moment gewerkt aan nieuwe in vitro technologieën om microvessels op een chip te laten groeien en te visualiseren als een mogelijk alternatief voor in vivo studies. De effecten op microvasculaire verdunning in de nieren zijn echter complex en op dit moment is het chipmodel nog niet compatibel met dezelfde fysiologische omstandigheden. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven door gebruik te maken van de contralaterale nier als controle en het combineren van uitleesgroepen om significante gegevens te verkrijgen. Daarnaast zal de IRI procedure uitgevoerd worden door zeer bekwaam personeel waardoor de intra-experimentele variatie zal verminderen en er minder dieren per experiment nodig zijn om betrouwbare en statistisch significante gegevens te verkrijgen. Naar inzien van de DEC zijn de beschreven go/no-go momenten realistisch, helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. Daarnaast worden na de operatie voer en solid drinks op de bodem van de bak aangeboden. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke muizen omdat deze gevoeliger zijn voor de nier IRI. Daarnaast is de IRI procedure bij vrouwelijke muizen veel complexer omdat de bloedvaten van de eierstok dicht bij de nieraders liggen. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Diverse weefsels zullen uit het dier gehaald moeten worden voor verdere analyse. Dit is van essentieel belang om de experimenten goed te beoordelen en is niet mogelijk zonder het dier te doden. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

*NTS*

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

## **D. Ethische afweging**

1. Rechtvaardigt het bestuderen van componenten die leiden tot hypercoagulabiliteit en het effect van antistollings interventies en/of de remming van bloedplaatjes op vasculaire remodelling in een nier ischemie/reperfusie letsel model, met als uiteindelijke doel het ontwikkelen van nieuwe moleculaire behandelingen voor patiënten met atriale fibrillatie (AF) en het voorkomen van de progressie en complicaties hiervan, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het identificeren van de optimale antistollingsbehandeling om zowel het risico op beroerte als de progressie van atriale fibrose tegen te gaan.  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.  
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.  
Waarden die voor de patiënten (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.  
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.  
Atriale fibrillatie (AF) is een leeftijd gerelateerde aandoening die door de vergrijzing van de populatie steeds vaker voor zal komen. AF begint vaak onopgemerkt, waardoor het zich vrij kan ontwikkelen alvorens het wordt geconstateerd met alle nadelige gevolgen, zoals hartfalen en herseninfarct, van dien. Doordat AF een progressieve aandoening is wordt verwacht dat de kosten van de diagnostiek en behandeling van AF de komende decennia flink zullen toenemen Het progressieve verloop van de ziekte ontstaat door fibrose in de atria. Het fibrotische weefsel kan het fibrilleren opwekken en het fibrilleren leidt weer tot meer fibrose. De rol van coagulatie in atriale fibrillatie is onlangs in eerder onderzoek aangetoond, echter is het mechanisme achter coagulatie geïnduceerde fibrose nog niet bekend. De DEC acht het in kaart brengen van het effect van antistollingsremmers op micro vasculair verlies van essentieel belang voor het ontwikkelen van een antistollingsstrategie dat bij AF zowel de kans op een herseninfarct als fibrose van het hart op lange termijn tegen kan gaan. zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet

en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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  
AVD1160020171765

**Bijlagen**

2

Datum 24 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 augustus 2017. Het gaat om uw project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1160020171765. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

24 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1160020171765

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
24 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1160020171765

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600  
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 27366422  
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2  
Postbus: 9600  
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN  
IBAN: NL11DEUT0451001400  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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  
AVD1160020171765

**Bijlagen**

2

Datum 24 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 24 augustus 2017

Vervaldatum: 23 september 2017

Factuurnummer: 171765

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1160020171765	€ 1035,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**Van:** [redacted]  
**Verzonden:** woensdag 30 augustus 2017 10:00  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**Onderwerp:** FW: vraag bij de behandeling van AVD1160020171765  
**Bijlagen:** aangepast appendix-description-animal-procedures-1.3 [redacted]  
29082017.docx; aangepast 29082017 [redacted] 03\_AVD1765\_nts.docx

**Categorieën:** Dossier: [redacted]

Beste [redacted]  
Bij deze ook de aangepaste NTS. Ik hoop u hiermee voldoende informatie te hebben gegeven anders hoor ik het graag.  
Met vriendelijke groet,  
[redacted]

---

**From:** [redacted]  
**Sent:** dinsdag 29 augustus 2017 13:25  
**To:** 'Info-zbo'  
**Subject:** RE: vraag bij de behandeling van AVD1160020171765

Beste [redacted],  
Bij deze heb ik de Appendix aangepast. Ik snap de verwarring ik heb de getallen aangepast naar de exacte berekeningen. We hebben het omhoog afgerond voor onverwacht uitval en had meegekregen dat dit kon. Bedankt voor de feedback, ik wacht jullie advies verder af.  
Met vriendelijke groet,  
[redacted]

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** dinsdag 29 augustus 2017 13:14  
**To:** [redacted]  
**Cc:** Instantie voor Dierenwelzijn (BEHDIV5)  
**Subject:** vraag bij de behandeling van AVD1160020171765

Geacht mevrouw [redacted]  
U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een vraag. Het betreft uw project: 'The role of the coagulation system on microvascular rarefaction' met aanvraagnummer AVD1160020171765.

De berekening van de dieraantallen is niet helemaal duidelijk; u geeft voor beide scenario's een exacte berekening, n=252 en n=462 maar u rond dit af naar n= 280 en n=490 maximaal. Waarom rekent u nog met extra dieren? Is er sprake van een uitvalspercentage?

Kunt u de dieraantallen verder verduidelijken en als het nodig is de bijlage dierproeven en de NTS aanpassen als de aantallen veranderen?

Uw aanvraag zal in de CCD vergadering van 15 september besproken worden. Totdat de antwoorden ontvangen zijn is de behandeltijd opgeschort,

Vriendelijke groet, [redacted]  
Namens **Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 1             | Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model. |
- 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.

The well-established model of ischemia reperfusion (I/R) injury in the kidney will be used to determine the effect of the coagulation pathway in the process of microvascular rarefaction and leakage. The direct anti-coagulants (DOACs), dabigatran and rivaroxaban, platelet inhibitor and the FXII-inhibitor (antibody) are known to act on different levels of the coagulation cascade. Using these different agents in combination with the IRI model, makes it a highly suitable model to elucidate the role of the coagulation cascade on microvascular rarefaction.

We will include different animal groups related to the following read outs:

- 1) ECs and PCs will be quantified to determine microvascular loss. [IHC]
- 2) Fibrosis and the extent of kidney-injury will be quantified by staining of tissue sections with Sirius red and the kidney-injury-marker (KIM-1) respectively. [IHC]
- 3) Microvascular leakage will be visualized using a tracing protocol in which albumin that has leaked into extravascular spaces is stained with Evans Blue. [IHC]

Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, where we combine Evans Blue with IHC staining, we might combine read out 2 and 3 to lower the amount of animal groups when possible.

We would like to implement the following experimental setup:

Pilot groups:

1) To define the sensitivity of the project related transgenic mouse strains like TIE2/NG2 for I/R- induced microvascular loss and fibrosis, different ischemia- and reperfusion times will be tested. This pilot study will be used to choose the best I/R time for the other experiments in this Appendix. The mice will be sacrificed at day 2 (n=3) and day 14 (n=3), based on experience these time points are most relevant to study microvascular loss and fibrosis respectively. We will use maximal 3 different ischemic time points in combination with 2 different reperfusion time points, a total of 6 groups, when the first 2 ischemia time points are not informative enough.

Group	Ischemia time	Reperfusion time	Read out
1	30 min	2 days	IHC
2	30 min	14 days	IHC
3	45 min	2 days	IHC
4	45 min	14 days	IHC

2) In this group, peripheral blood samples will be used for analysis of efficacy of treatment with Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor or FXII-inhibitor. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

Group	Drug	Activity assay
1	Rivaroxaban	FXa chromogenic substrate
2	Dabigatran	PT
3	Platelet inhibitor	Aggregation assay
4	Antibody FXII	aPTT

Main experiment:

Treatment groups based on unilateral I/R kidney injury:

- 1) placebo +IRI
- 2) Dabigatran +IRI
- 3) Rivaroxaban +IR
- 4) Platelet inhibitor +IRI
- 5) Rivaroxaban + Platelet inhibitor +IRI
- 6) FXIIa inhibitor + IRI
- 7) Isotype antibody

This classification will be used for every procedure, including the types of read out and reperfusion time.

Procedure	Model	Reperfusion time	Read out
1	IRI	15 min	Evans Blue (IHC*)
2	IRI	Day 2	Evans Blue (IHC*)
3	IRI	Day 14	Evans Blue (IHC*)

\*Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, we decide to combine Evans Blue and IHC staining unless the staining on pre-existing tissue slides could not be combined.

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

The following transgenic mouse strain will be used:

A transgenic mouse strain that expresses green-fluorescent protein (GFP) under the TIE-2 promotor to trace the ECs and Tomato-red fluorescent protein (RFP) under the NG2-promotor to trace pericytes.

Eight weeks old male mice will receive peri-operative analgesia after which unilateral renal IRI will be induced. This will be achieved by a midline laparotomy approach for the surgery with one incision allowing clamping of the renal pedicle to induce ischaemia of the kidney for 30 or 45 minutes, following reperfusion\*. After verification of kidney colour to change back to red, the mice will be closed and adequate pain killing will be applied for 48 hr. Mice will be killed by terminal anaesthesia or under isoflurane anaesthesia receiving an i.v injection with 50 ul 1% Evans Blue solution in PBS, 20 min before the end of the perfusion time. In the Evans Blue group, 0.5 ml blood will be collected via a heart puncture and the animals will be bled via the right atrium and perfused with PBS via the left ventricle of the heart. Evans blue will be quantified in the blood and kidney of the mice. In all groups both kidneys will be excised, one as control and the other to examine Evans Blue- or protein staining\*.

We will administer the following drugs in the intervention protocol: Dabigatran (anti-FIIa), Rivaroxaban (anti-FXa), platelet inhibitor, Rivaroxaban + platelet inhibitor, anti-FXIIa antibody, placebo or an isotype antibody. The drugs will be administered intravenously via vena jugularis 5 min after induction of ischemia in a 100 µl volume. After 15 min of reperfusion, the drugs will be applied a second time in the same way and dosages compared

to the first administration. Our collaborators in Maastricht found from older experiments that coagulation inhibitors showed a protective effect on the inflammatory responses after IRI with the highest effectiveness when administering the anticoagulants during the ischemic- and reperfusion period.

At 15 min and at day 2 and day 14 after kidney IRI, the mice will be sacrificed with terminal anaesthesia and bled after which tissue will be collected. The group of mice used for Evans Blue staining will be bled via a heart puncture.

\*dependent on the outcome described in Figure 3.

---

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

---

Vascular IRI pilot group:

Based on LUMC DEC 13037: For the pilot group we will use 3 animals per group to make a decision on the best IRI-time. This is necessary to establish the minimal relevant difference by IRI with the least amount of mice for the intervention study.

Drug-dosage pilot group:

Based on MUMC 2014-036: Medication will be administered intravenously via the vena jugularis in a 100 µl volume (Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor and FXII-antibody) under anaesthesia and medication will be applied a second time 50 min after the first administration. After 30 min the mice will be killed and bled. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

Drug-intervention study:

Student's t-test results with a confidence interval of 5% ( $\alpha=0.05$ ), and power capacity of 80% ( $\pi=0.8$ ):  $Z_{\alpha/2} - Z_{\pi} = (n/2)^{1/2} * (\mu_1 - \mu_2) / \sigma$

Based on MUMC 2014-036: variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in reduction of rarefaction or in immunohistochemistry and protein parameters through administration of Dabigatran or Rivaroxaban, 9 animals are required for each group.

Microvascular leakage group:

Student's t-test results with a confidence interval of 5% ( $\alpha=0.05$ ), and power capacity of 80% ( $\pi=0.8$ ):  $Z_{\alpha/2} - Z_{\pi} = (n/2)^{1/2} * (\mu_1 - \mu_2) / \sigma$

Based on LUMC DEC 13037: the variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in microvascular leakage with a power of 0,8 and a P-value of 0,05%, 9 animals are required for each group.

Based on previous experiments, we expect a loss of 10% in animals (during experiments and tissue workup), therefore we would ask for 10 animals per read out-group.

---

---

**B. The animals**

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

Species: TIE2/NG2 male mix C57BL6/Agouti and FVB/N background at age of 8-12 weeks, breeding facilities of the LUMC.

Based on (a) the knowledge that male mice are more sensitive to kidney (IRI), (b) the female procedure of IRI is complex because the arteries of the ovary are in close proximity with the renal arteries and (c) based on experience from previous research we prefer male mice in our experiment.

Dependent on the outcome described in Figure 3-2 we select either 1 or 2 read out groups, calculation 1 or 2 will follow:

1) Unilateral + 2 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add maximal 2 groups extra is 18 animals.

Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.

Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 1x read out (Evans blue / IHC) , is 210 animals.

Total: 252 animals.

2) Unilateral + 3 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add 3 animals if fibrosis is not confirmed at day 14 (2x) is 18 animals.

Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.

Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 2x read out (Evans blue / IHC) , is 420 animals.

Total: 462 animals.

---

**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 most significant task in this project is to obtain information of drug intervention at the stage of ischemia and reperfusion and their effect on microvascular rarefaction and leakage in vivo. At the moment we are working on new in vitro technologies to grow and visualize microvessels on a chip as a possible alternative for in vivo studies.

However, the effects on microvascular rarefaction in the kidney are complex and at this

---

moment the chip model is not yet compatible with the same physiological conditions. We want to look at microvascular rarefaction which is a process of ECs-PCs destabilisation and at this moment the chip contains solely ECs. Also, our proposed experiments cannot be performed in patients, since renal tissue is needed to examine the direct effect of drug administration on IRI microvascular rarefaction. Therefore, there is no alternative method. With regard to the selection for a murine model, we already performed these experiments – IRI in the kidney – in the mouse and could establish good techniques and interpretable results.

#### Reduction

The IRI operation will be performed by highly skilled and experienced staff, which will reduce intra-experimental variation and as such will result in fewer animals that will be needed per experiment to obtain reliable and statistically significant data. Furthermore we include in vitro and in vivo pilot studies in our proposal to delineate the number of animals needed for our research questions as precise as possible. Dependent on the outcome described in Figure 3 we might be able to reduce the number of animals in this project, by using the contralateral kidney as control and combine read out groups to obtain significant data.

#### Refinement

IRI surgery and drug administration will be performed under isoflurane anaesthesia. Pre- and post-operative analgesia will be administered to reduce the pain. If any of the animals develop any state described as humane endpoint, the animals will be humanely sacrificed, with an appropriate pentobarbital dose. Finally, experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. After surgery we provide the animals with solid and liquid chow in case they have difficulties chewing.

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

Animal suffering will be minimised where possible through the use of adequate anaesthesia and pain reduction. Any procedures will be carried out under complete anaesthesia. Following the procedures the animals will be receive adequate pain relief in order to decrease animal suffering as much as possible. The study is not expected to cause any adverse effects on the environment.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

n.v.t.

## 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 and perioperative analgesia will be applied in all experiments.

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

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

The known adverse effect are drowsiness due to the analgesia after I/R kidney injury operation. Overall the animals behave normal after the surgery.

Explain why these effects may emerge.

Analgesia effect.

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

Accurate peri-analgesia anaesthesia administration will be performed by highly skilled and experienced staff.

### **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.

- In case of complications during or after surgery, direct euthanasia will be performed.
- Euthanasia will be performed on all animals suffering from disease or pain despite analgesia (within the experimental procedure or after the preparative surgery). Qualified staff and the project applicant will judge whether animals suffer from pain, based on experience and common sense. The experienced employees of the animal facility will also judge discomfort.
- We will set up a list to score and judge the severity of the following signs: Weakness, fur and nutritional problems, signs of infection (round back, non-movement, shaky).

- Animals will be removed from the experiments when they suffer from weight loss 15% of their body weight in 1-2 days.
- When the operation wound gets infected and lead to suffering or when the animals hurts itself euthanasia will be induced.

Indicate the likely incidence.

Based on experience with previous experiments the incidence is expected to be very low.

#### **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').

i.v injection drug under anaesthesia: mild

IRI under anaesthesia: Moderate; animals have to recover from anaesthesia.

Overall discomfort: 'moderate'

### **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.

To analyse microvascular rarefaction using FACs sorted ECs and PCs, to stain for fibrosis in the kidney and to quantify leakage using Evans blue protocol mice need to be sacrificed.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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

AVD1160020171765

**Bijlagen**

1

Datum 18 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 22 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction" met aanvraagnummer AVD1160020171765. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 30 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd de dieraantallen toe te lichten. U heeft bijlage 3.4.4.1 en de NTS aangepast.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction" starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 september 2017 tot en met 1 juni 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 juli 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
18 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1160020171765

### **Bezwaar**

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

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

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

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

### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven



Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Academisch Ziekenhuis Leiden  
**Adres:** Postbus 9600  
**Postcode en plaats:** 2300 RC LEIDEN  
**Deelnemersnummer:** 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 september 2017 tot en met 1 juni 2021, voor het project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction" met aanvraagnummer AVD1160020171765, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD Student.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 augustus 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 augustus 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 juli 2017, ontvangen op 22 augustus 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 30 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model.</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	462	100% Matig	

### Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

**Aanvraagnummer:**  
AVD1160020171765

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD1160020171765

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD1160020171765

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

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

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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