

		Inventaris Wob-verzoek W17-12								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20172225	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel				x		x	x	
4		Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5		DEC-advies				x		x	x	
6		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7		Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
8		Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
9		Adviesnota CCD		x						x
10		Beschikking en vergunning				x		x	x	

19 JUN 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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 ☐ 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>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>Instantie voor dierenwelzijn</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9				
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen											
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn											
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9											
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td><td>Geert Grooteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101, [redacted]</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10	Postbus	9101, [redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10											
Postbus	9101, [redacted]											
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen											
IBAN	NL90ABNA0231209983											
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud											
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td>[redacted] ☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Hoogleraar</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] ☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	Hoogleraar	Afdeling	[redacted]	Telefoonnummer	[redacted]	E-mailadres	[redacted]
(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☒ Dhr. ☐ Mw.											
Functie	Hoogleraar											
Afdeling	[redacted]											
Telefoonnummer	[redacted]											
E-mailadres	[redacted]											
1.5	(Optioneel) 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>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres	
(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.											
Functie												
Afdeling												
Telefoonnummer												
E-mailadres												

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie	Instantievoor Dierenwelzijn	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

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

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag	> Ga verder met vraag 3
☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn	
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2	
☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn	
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3	

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

☐ Ja	> Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
☐ Nee	> Ga verder met vraag 3

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

☐ Nee	> Ga verder met vraag 3
☐ Ja	> Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

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

Startdatum	1 4 _ 0 7 _ 2 0 1 7
Einddatum	1 4 _ 0 8 _ 2 0 1 9

- 3.2 Wat is de titel van het project?

The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment

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

Kan extra magnesium de ontwikkeling van problemen aan hart- en vaten bij chronische

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

Naam DEC	RU DEC
Postadres	Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted]
E-mailadres	[Redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	16 - 06 - 2017
Handtekening	

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☐ Translational or applied research ☐ Regulatory use of routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ 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.

Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with chronic kidney disease (CKD). Although the prevalence of traditional risk factors, like hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia is high in these patients, these factors account only partially for the high cardiovascular risk. Besides traditional risk factors, kidney specific and also unknown non-traditional risk factors are involved. (1) Vascular calcification and diastolic heart failure are common manifestations of cardiovascular disease in these patients, and are assumed to contribute to this risk.

The role of magnesium in the development of calcification and heart disease has recently gained attention. Magnesium is an inorganic ion that is involved in many enzymatic reactions and influences the passage of other electrolytes across the cell membrane. As a consequence, it is involved in many physiological functions like neuromuscular conductivity and muscle contraction and relaxation, affecting the heart and blood vessels. In non-CKD patients, clinical observational studies have demonstrated associations of lower serum Mg levels with mortality and cardiovascular disease, including coronary calcification, atrial fibrillation and progression of left ventricular hypertrophy. (2-5) Magnesium homeostasis is dependent on renal regulation. As a consequence, patients with decreased renal excretory function of end-stage renal disease tend to have plasma magnesium levels in the upper range of normal (or less frequently even above), and this can be considered protective. Indeed, in patients on dialysis multiple observational studies, including a post-hoc analysis of data from European dialysis patients performed in the VU medical center in Amsterdam, showed that the protective effect on mortality was linear even beyond the upper range of normal for magnesium concentration.(6) Importantly, this study revealed that especially reductions in cardiovascular mortality, including sudden death contributed to this improvement.(6) Apparently, the

optimal range of magnesium levels in dialysis patients is different from the normal range in the healthy population. Moreover, the optimal concentration of magnesium for these patients and patients with less severe stages of renal insufficiency is higher than the concentration that is most frequently present in these patients. These observational data point towards lower magnesium concentration as a novel risk factor for cardiovascular disease in CKD. A possible explanation for a different optimal value in patients with CKD could be a change of binding of other molecules in blood plasma to magnesium, a change of the distribution of magnesium between different body compartment, and a change of the availability of other electrolytes (like calcium and phosphate) that contribute to ectopic calcification. In this situation, a higher magnesium level could offer protection.

Possible biological mechanisms underlying these associations are insufficiently explored. Based on the biological functions of magnesium, with a role in multiple enzymatic reactions and influence on passage of electrolytes across the cell membrane, many protective mechanisms of magnesium that are disturbed in CKD are possible.

Preliminary *in vitro* studies in vascular smooth muscle cells (VSMC) have also linked low magnesium concentrations to vascular calcification. For vascular calcification specifically, multiple protective mechanisms of magnesium have been suggested.

Vascular calcification consists of components that are normally found in bone tissue. In the developmental process of vascular calcification, an extracellular matrix is created of proteins that can also be found in the bone, including collagen and osteonectin. This extracellular matrix is then deposited with hydroxyapatite, which is a mineral of calcium and phosphate ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) thereby resulting in a calcified matrix. The bone-specific matrix proteins are produced by smooth muscle cells in the blood vessel wall that are differentiated towards a bone-like phenotype due to the expression of bone-specific genes. This changed gene expression pattern is induced by an excess of calcification stimulating factors like an increased amount of phosphate. Hydroxyapatite depositing of the extracellular matrix is stimulated by matrix vesicles that are excreted by the bone-like vascular smooth muscle cells and contain calcium, phosphate and enzymes. These matrix vesicles contain an excess of calcium and phosphate and a decreased amount of calcification inhibiting proteins (like MGP) and form a nidus for the formation of hydroxyapatite crystals that subsequently deposit in the extracellular matrix.(7) High calcium and phosphate concentrations, as in chronic kidney disease, are key factors in the calcification process.

Recently, it was shown that in bovine VSMC, Mg^{2+} inhibited b-glycerophosphate-induced calcification.(8) Equally, in unpublished *in vitro* studies in human VSMC, performed at the [REDACTED] of the Radboud University Medical Center, there was complete inhibition of

dihydrogenphosphate-induced calcification in the presence of Mg^{2+} in the surrounding medium. The molecular mechanisms underlying these *in vitro* observations have not been elucidated. Possible modes of action of magnesium include a direct inhibitory effect of extracellular magnesium ions on the formation of calcium-phosphate crystals outside the cell, inhibition of excess calcium influx into smooth muscle cells by inhibition of calcium channels by magnesium, triggering of the calcium-sensing receptor resulting in an unknown molecular mechanisms that inhibits calcification, or intracellular signalling of magnesium towards a calcification inhibitory mechanism for example inhibition of the expression of bone-like genes (by an unknown molecular mechanism). Involvement of reduced activity of the magnesium transporter TRPM7 was shown in rat VSMC with dihydrogen-induced calcification. The mechanism underlying this reduction of TRPM7 activity was unknown. In these cells, inhibition of calcification in the presence of magnesium, was associated with restored TRPM7 activity, and the calcification phenotype was recapitulated again after inhibition of TRPM7 activity by the TRPM7 inhibitor 2-APB.(9)

In addition to the molecular regulation at the cellular level, complex interactions between organs and regulatory mechanisms including hormonal factors are involved in the pathogenesis of cardiovascular complications in CKD. Data from *in vivo* studies, that can take into account these mechanisms, are limited.

One study evaluated the effects of dietary magnesium intake on vascular calcification in a rat model of adenine-induced CKD. In this study, vascular calcification assessed with von Kossa staining and quantitative colorimetric measurement was significantly reduced in animals that were fed a high (0.2%) magnesium diet compared to animals on a low (0.05%) magnesium diet.(10) The mechanisms responsible for this difference between the groups, were unknown.

A major disadvantage of the adenine-induced CKD model is the presence of adenine and its metabolites in the circulation, with potential direct or indirect effects of these substances on the vessel wall and the calcification process. Another frequently used and the longest existing method to induce CKD in animals, is the partial nephrectomy procedure, that selectively targets the kidneys.(11) In this procedure, the functional kidney volume is surgically reduced leading to a research model that resembles chronic kidney disease. This model can be used to study the hypothesis of a causal relationship between lower magnesium intake (and plasma levels), and cardiovascular complications in chronic kidney disease, and explore the pathophysiological mechanisms that may be involved.

If the protective effect of magnesium on cardiovascular complications in CKD, can be confirmed, this offers new perspectives for therapeutic strategies by increasing plasma magnesium levels or directly target the molecular mechanisms involved, with the ultimate goal to decrease cardiovascular disease in patients with CKD.

The hypothesis of this project is that as a result of an increased dietary magnesium content in a rat model of CKD, both the incidence and intensity of vascular calcification (defined as a lower calcium content of the arteries at the end of follow-up) improve and less cardiac hypertrophy (determined as a lower cardiac mass relative to body weight at the end of follow-up) occurs .

1. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*. 2013;382(9889):339-52.
2. Reffelmann T, Ittermann T, Dorr M, Volzke H, Reinthaler M, Petersmann A, et al. Low serum magnesium concentrations predict cardiovascular and all-cause mortality. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):280-4.
3. Hruby A, O'Donnell CJ, Jacques PF, Meigs JB, Hoffmann U, McKeown NM. Magnesium intake is inversely associated with coronary artery calcification: the Framingham Heart Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7(1):59-69.
4. Khan AM, Lubitz SA, Sullivan LM, Sun JX, Levy D, Vasan RS, et al. Low serum magnesium and the development of atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2013;127(1):33-8.
5. Reffelmann T, Dorr M, Ittermann T, Schwahn C, Volzke H, Ruppert J, et al. Low serum magnesium concentrations predict increase in left ventricular mass over 5 years independently of common cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):563-9.
6. de Roij van Zijdewijn CL, Grooteman MP, Bots ML, Blankestijn PJ, Steppan S, Buchel J, et al. Serum Magnesium and Sudden Death in European Hemodialysis Patients. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143104.
7. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research*. 2011;109(6):697-711.
8. Kircelli F, Peter ME, Sevinc Ok E, Celenk FG, Yilmaz M, Steppan S, et al. Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(2):514-21.
9. Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H, Burger D, Chignalia AZ, Wadhera V, et al. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium. *Hypertension*. 2010;56(3):453-62.
10. Zelt JG, McCabe KM, Svajger B, Barron H, Laverty K, Holden RM, et al. Magnesium Modifies the Impact of Calcitriol Treatment on Vascular Calcification in Experimental Chronic Kidney Disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;355(3):451-62.

11. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. Am J Nephrol. 2010;31(6):471-81.

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?

In this research project, main objective is to determine if an increased dietary magnesium content improves the incidence and intensity of vascular calcification (part A) and decreases occurrence of cardiac hypertrophy (part B).

In one part (part A), we will study the effects of different dietary magnesium content, on the occurrence and time of initiation and progression of vascular calcification in rats with impaired renal function prone to develop calcification. In the other part (part B), we will study the effects of different dietary magnesium contents, on the occurrence and time of initiation and progression of cardiac remodeling and dysfunction, in rats with decreased renal function.

The specific objectives for part A and B are to answer the following questions:

Part A:

Objective 1. (Main objective part A) Does a high dietary magnesium decrease the occurrence of vascular calcification in CKD?

Objective 2. Does a high dietary magnesium retard initiation and progression of vascular calcification in CKD?

Objective 3. What is the molecular and genetic background of magnesium-related protection against vascular calcification?

Part B:

Objective 4. (Main objective part B) Does a high dietary magnesium decrease the occurrence and retard initiation and progression of cardiac remodeling (like hypertrophy and fibrosis) and cardiac dysfunction in CKD?

Objective 5. What is the molecular and genetic background of magnesium-related cardiac protection?

To address these questions, we will use a Sprague-Dawley rat CKD model induced by means of surgical reduction of kidney volume and a phosphate-

enriched diet to promote development of vascular calcification. This is an established animal model for CKD, operational in our institution, and leading to vascular calcification.(11)

Previous studies have also shown that plasma magnesium concentrations in rats can be changed by modulation of dietary magnesium content.(10) Combining the experience and facilities of two academic centers will be complementary in this project. The project will be located partly in the Radboud university medical center and partly in the VU medical center. In the combined centers, there is broad experience with research focusing on molecular mechanisms involved in the transport and effects of ions like magnesium in the context of kidney disease, as well as vast experience in research and techniques focusing on cardiovascular diseases. Also, both centers are qualified and experienced in animal research. For the above mentioned reasons, this project is achievable within the requested time frame.

10. Zelt JG, McCabe KM, Svajger B, Barron H, Lavery K, Holden RM, et al. Magnesium Modifies the Impact of Calcitriol Treatment on Vascular Calcification in Experimental Chronic Kidney Disease. J Pharmacol Exp Ther. 2015;355(3):451-62.

11. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. Am J Nephrol. 2010;31(6):471-81.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

In the renal scientific field, the role of magnesium has been underestimated for a long time. This project will draw attention to the role of magnesium in vascular calcification and CKD. It will offer new insights in the effects and biological mechanisms of magnesium in vascular calcification and the heart in CKD. The results of this project can be the starting point for new translational research focusing on vascular calcification and the role of magnesium. In addition, a future step following this project can be a clinical trial to evaluate the effect of increased plasma magnesium on clinical outcome in patients.

Relevance for renal patients

In The Netherlands over 1 million patients have CKD and over 60,000 patients are suffering from more advanced kidney disease. In 2014, 6463 patients were on dialysis. Yearly, 1 of 6 dialysis patients dies, frequently due to cardiovascular disease.(12, 13) As important as these grim mortality numbers is the high burden of morbidity, hospitalizations and subsequently quality of life due to these cardiovascular complications. If indeed, as hypothesized, magnesium can partially prevent and ameliorate vascular calcification and cardiac remodeling and dysfunction, magnesium balance

can be an attractive therapeutic target to reduce cardiovascular morbidity and increase health and quality of life in patients with CKD. For these patients quality of life and long-term maintenance of health with minimal co-morbidities, has major importance. If magnesium can be increased for instance by individualizing the concentration of magnesium concentration in the dialysate, this could be a simple and cost-effective method to reduce cardiovascular risk in patients dependent on dialysis. Most importantly, also in patients not depending on dialysis magnesium intake can be increased easily, safe, and at low costs. If ultimately proven effective, different ways to supplement magnesium can easily be implemented, as such making this intervention on magnesium feasible for non-dialysis patients too.

Economic relevance

If magnesium inhibits vascular calcification, cardiac remodeling and dysfunction in CKD, and ultimately in future research is proven that cardiovascular complications in CKD can be reduced by external supplementation of magnesium, this therapy can lead to reduction of health care costs since magnesium is inexpensive. The costs of cardiovascular disease are 8.3 billion euros per year in the Netherlands only, taking up 9.2% of total health care budget.⁽¹⁴⁾ Therefore, savings on cardiovascular disease could considerably lower total health care expenses. Additionally, insight in the molecular mechanisms involved, could also facilitate the development of other therapies targeting these calcification regulating mechanisms.

12. www.nierstichting.nl, facts and figures 13. www.renine.nl/statistics 14. RIVM: www.kostenvanziekte.nl

3.4 Research Strategy

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

This project is designed to elucidate the role of magnesium in the development and progression of cardiovascular disease in the context of chronic kidney disease.

We aim to achieve this by studying the effects of magnesium in an in vivo model of CKD. In a surgical procedure, we will reduce functional kidney tissue (nephrectomy of 3/4 - 5/6 of total kidney tissue) in Sprague Dawley rats, resulting in a model resembling CKD. Since in this model vascular calcifications (VC) develop especially when combined with a phosphate-enriched diet, we will feed the animals a synthetic diet with a high phosphate content, resulting in a model of CKD with its associated vascular calcifications, resembling human CKD-related VC. This model will be used for an experimental set-up with different magnesium conditions resulting from an intervention in dietary magnesium content to get insights into the effects of magnesium on the development of cardiovascular complications in CKD. In addition to VC, also cardiac remodeling and heart failure, typical with diastolic dysfunction, are characteristic for cardiovascular disease in CKD. As outlined previously, the incidence of these pathologies also inversely

correlate with magnesium concentrations in patients with CKD. Therefore, we will also address the effect of magnesium on the development and progression of cardiac remodeling and cardiac dysfunction in this animal model.

To answer the specific research questions, as outlined in paragraph 3.2, we will give diets with either a low or high magnesium content to nephrectomized rats to assess the effects of magnesium on calcification. We will evaluate calcification by analysis of the blood vessels (arteries) at the end of the experiment. To assess if a high magnesium retards the progression of vascular calcification in CKD, we will visualize calcification with imaging techniques (micro-CT) at different time points during follow-up.

To get insight into the underlying mechanisms, in blood samples and vascular tissue we can measure calcification associated factors (proteins and electrolytes) and expression of genes involved in calcification and magnesium transport.

To analyze the effects of magnesium on the heart, an experimental set-up will be used identical to the described set-up for the calcification part of the experiments, that is providing diets with high phosphate and different magnesium content to rats with CKD. We will analyze the influence of dietary magnesium on the heart by serial echocardiography (hypertrophy, function) and at the end of the experiment after sacrifice of the animals by macroscopic (hypertrophy) and histological examination of cardiac remodeling (hypertrophy and fibrosis). Moreover, we will measure markers of heart failure (ANP, BNP) in blood.

To get insights into the molecular mechanisms, we will measure the expression of genes and proteins involved in cardiac remodeling and magnesium transport in heart tissue, and measure cardiac markers of heart failure in blood samples.

Since in observational studies in dialysis patients (described in the background section), a lower plasma magnesium was also associated with sudden death, known to be most frequently a result of heart rhythm disturbances, we will also isolate cardiomyocytes from the living heart at the end of the animal experiment to study the in vitro effects on processes involved in electrical conduction in cardiomyocytes.

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.

Main experiment - Part A – calcification (location Radboudumc Nijmegen)

One week before the experiments start, the rats will arrive at the animal laboratory for acclimatization. Thereafter, the rats will receive a synthetic diet with standard conditions (magnesium 0.22%, normal phosphate) so that the animals can get used to eating a synthetic diet. After one week on the synthetic diet, the rats undergo surgery to reduce functional kidney volume. From this time on, the rats will receive a phosphate enriched

synthetic diet to facilitate development of calcification, and either a low or high magnesium diet. Vascular calcification will be visualized with micro-CT during follow-up, with intervals of at least one week and maximal 8 scans per animal. Blood samples will be collected to measure kidney function and electrolytes including magnesium and phosphate, maximal 3 samples per animal will be collected. Part of the animals will be housed in metabolic cages for 24 hours for collection of urine to measure electrolyte excretion. At the end of the study, the rats will be sacrificed for analysis of organs and tissue, to determine the degree of vascular calcification and factors involved in calcification and magnesium metabolism.

Main experiment - Part B – cardiac remodeling and function (location VU medical center Amsterdam)

For this part, study set-up will be the same as in part A: functional kidney volume will be surgically reduced and the rats receive a diet with high phosphate content and either low or high magnesium content. During follow-up, echocardiography will be performed to visualize cardiac morphology (e.g. presence of hypertrophy) and function, with intervals of at least 1 week and maximal 8 ultrasonography procedures. Blood samples will be collected for analysis of renal function, electrolytes and cardiac markers (e.g. ANP, BNP). Maximal 3 blood samples per animal will be collected. At the end of the study, the rats will be sacrificed, for analysis of organs and tissues, and from part of the animals isolation of cardiomyocytes also.

Preceding the main experiments, pilot studies will be performed. In the first pilot, different modulations of dietary magnesium will be validated. Rats will receive a diet with either low (0.05%), normal (0.22%) or high (0.48%) magnesium content for 2 weeks. The normal dietary magnesium is included so that we can see if the low and high dietary magnesium exert effects on plasma magnesium levels compared to the normal diet. Blood samples for analysis of plasma magnesium concentration will be taken with intervals, maximal once a week (=maximal 3 samples). We expect the low (0.05%) dietary magnesium to be well tolerated, since this magnesium content is recommended for rat diets by the American Institute for Nutrition.⁽¹⁵⁾ The diet that is normally used for rats in our animal facility contains 0.22% magnesium which is high above the recommended amount. If we would use this diet as comparator of the diet with the high magnesium content in the main experiments, we would expect the difference of effect on primary outcome parameters in the main experiments to be limited since the normal diet already contains more magnesium than needed. Therefore, we also use a diet with lower magnesium content (0.05%) in this pilot, that can be the comparator of the high magnesium diet in the main experiments. We expect to achieve the effect on plasma magnesium within 2 weeks. Therefore, follow-up will initially be 2 weeks in this pilot. Modulation of dietary magnesium could potentially cause hypo- or hypermagnesemia. Only if severe, this might have effects on wellbeing of the animal. Intensive daily monitoring ensures timely recognition of these effects on wellbeing (as described in detail in the "description of animal procedures"). We expect that the tested diets do not cause severe hypo- or hypermagnesemia. If the diets do not effectively modulate plasma

magnesium, or are not tolerated, the pilot is once more repeated with different dietary magnesium content or extended follow-up. In the repeated pilot, follow-up will be maximal 12 weeks and maximal 8 blood samples will be performed with intervals of at least 1 week.

In the second pilot, the model of nephrectomy and vascular calcification will be validated in the strain (Sprague-Dawley) used for these experiments. These rats are 5/6-nephrectomized and receive a diet with high phosphate content and low dietary magnesium. As in main experiment part A, vascular calcification will be visualized with micro-CT during follow-up with intervals of at least one week and maximal 8 scans per animal; maximal 8 blood samples will be collected; and at the end of the study, the rats will be sacrificed for analysis of organs and tissue, to determine the degree of vascular calcification. Follow-up (equal to duration of the dietary interventions) in this pilot will initially be 12 weeks. If the model appears not to be representative, the pilot can be repeated once after adaption of protocols based on results of the pilots. In case of ineffective development of vascular calcification, follow-up will be extended to maximal 16 weeks. In case of high animal loss combined with severe renal impairment (rise of creatinine high above 2 times baseline), nephrectomy can be reduced up to 3/4 of kidney volume. In the repeated pilot nephrectomy will be minimal 3/4 and maximal 5/6 of vital kidney volume. In case of unforeseen low prevalence of calcification, the model can be modified by the addition of exogenous calcitriol. Calcitriol is the active form of vitamin D and if added to the model it causes more severe calcification that occurs earlier.(16, 17) Initially, we will not use calcitriol because we only want to perform necessary interventions and induce only as much calcification as is needed in the experiment, so that we do not cause unnecessary animal suffering and also because by inducing more severe calcification it could be more difficult to determine an effect of magnesium.

After the pilots there will be a go / no go moment before proceeding to the main experiments. For proceeding to the main experiments it is required that survival is 70% or above, vascular calcification develops in $\geq 60\%$ of surviving animals and the magnesium diets are well tolerated and have any effect on serum magnesium levels (as is also depicted in figure 1 and 2).

15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
16. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzen E, Towler DA, Lacey D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(7):1370-7.
17. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 2008;73(3):300-7.

Project time-line

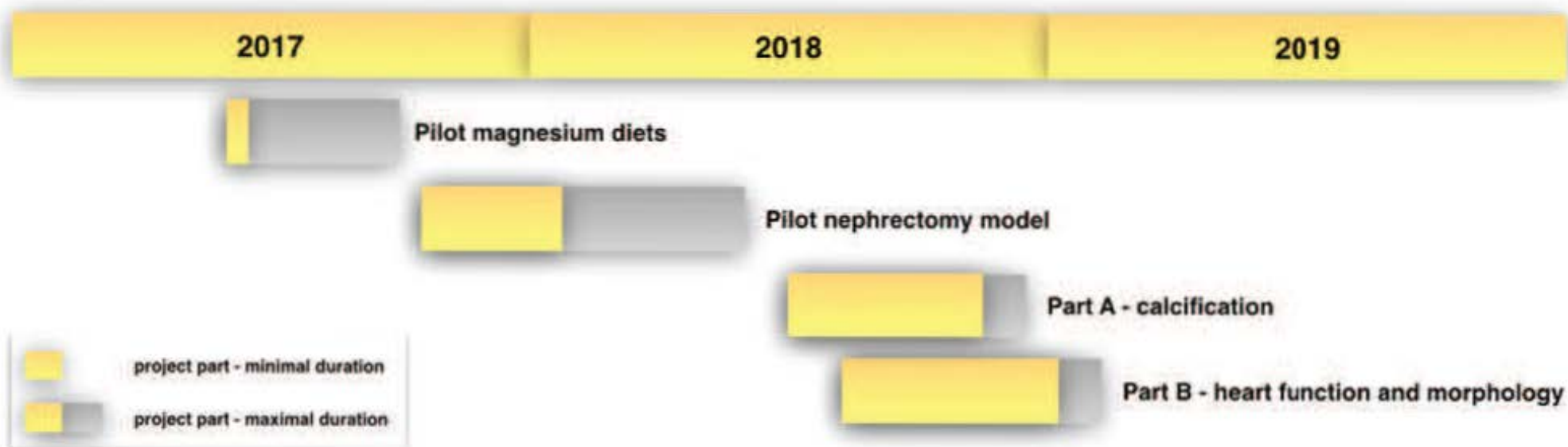


Figure 1. Pilot magnesium diets

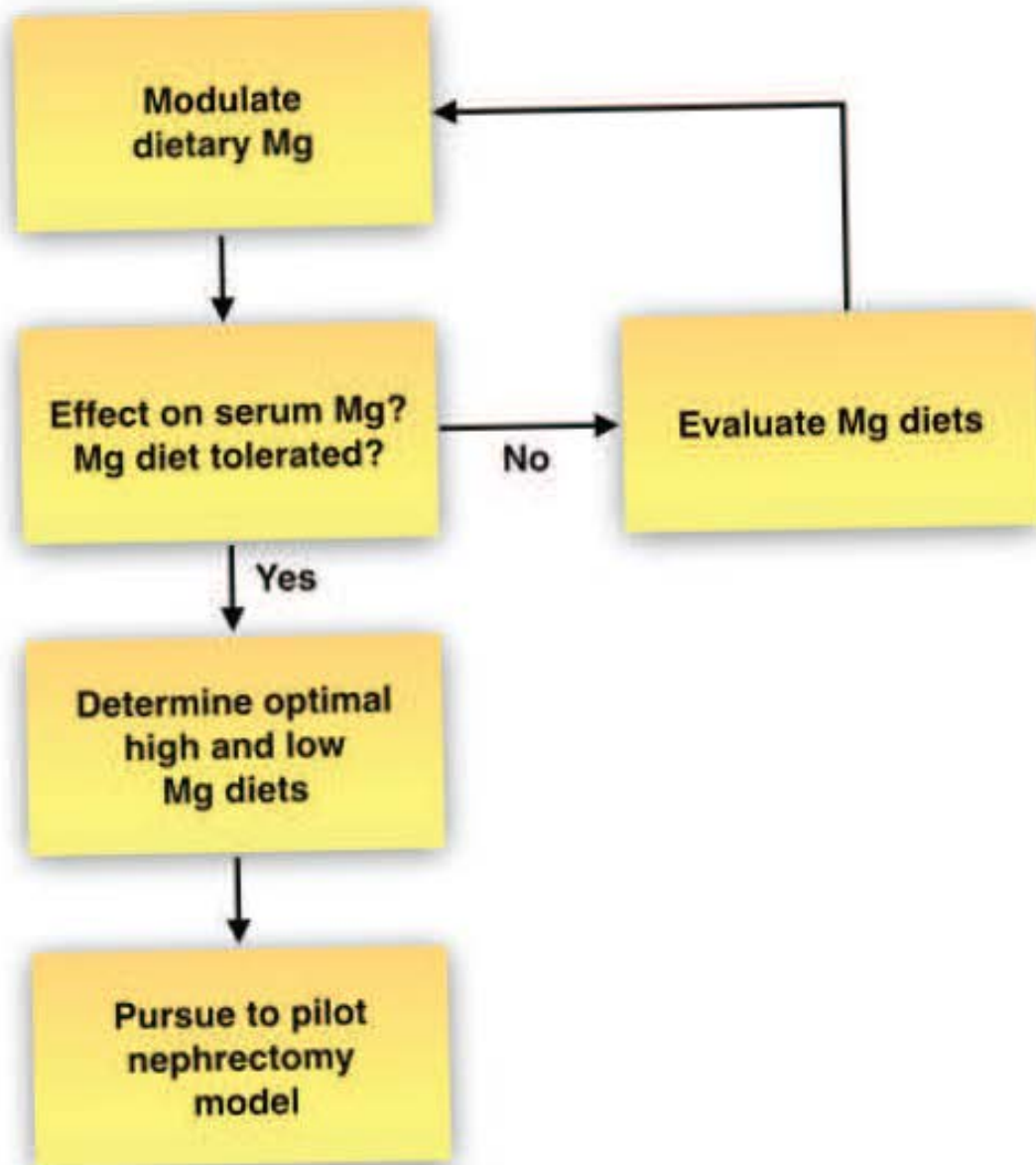


Figure 2. Pilot model nephrectomy + calcification

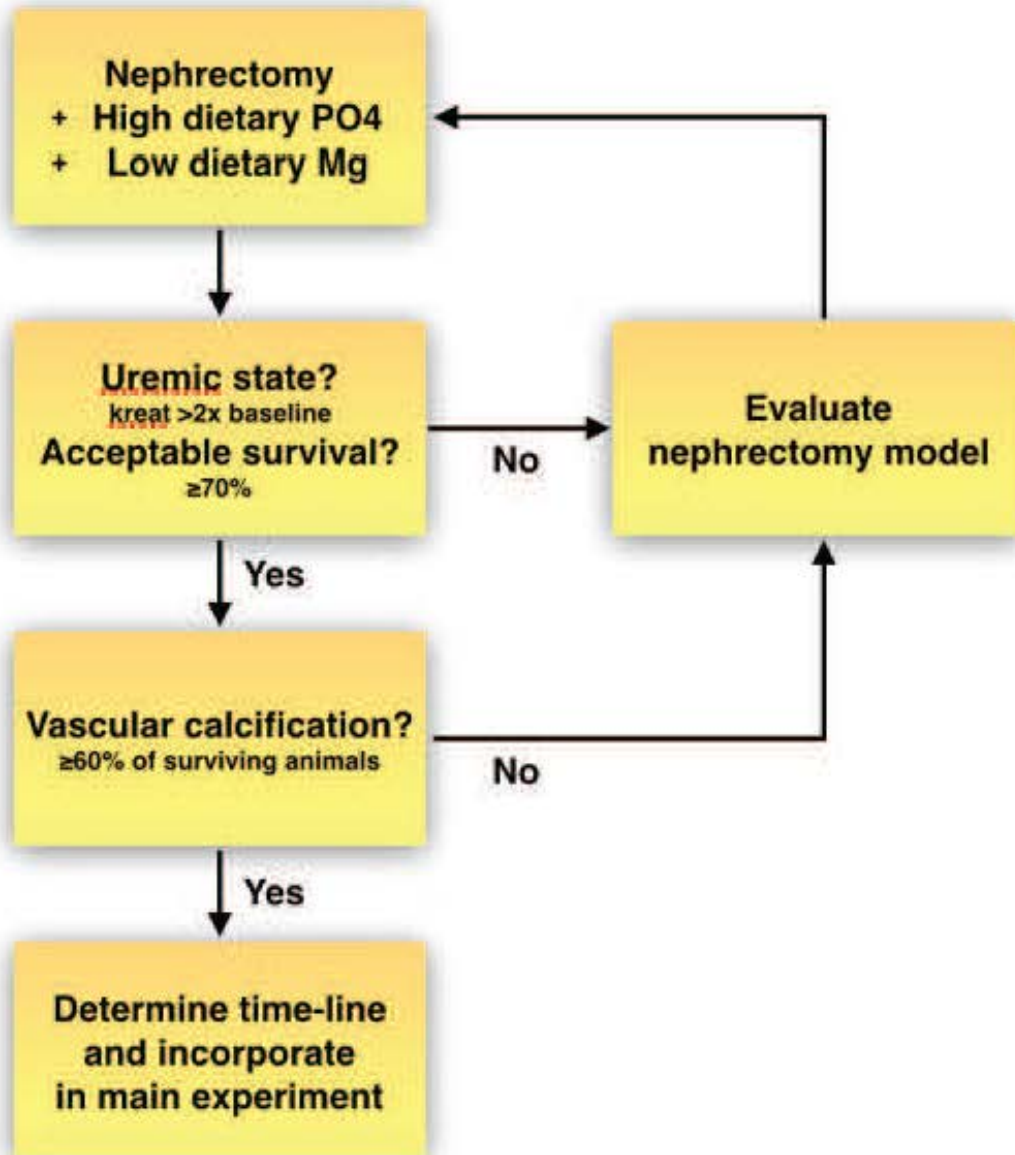
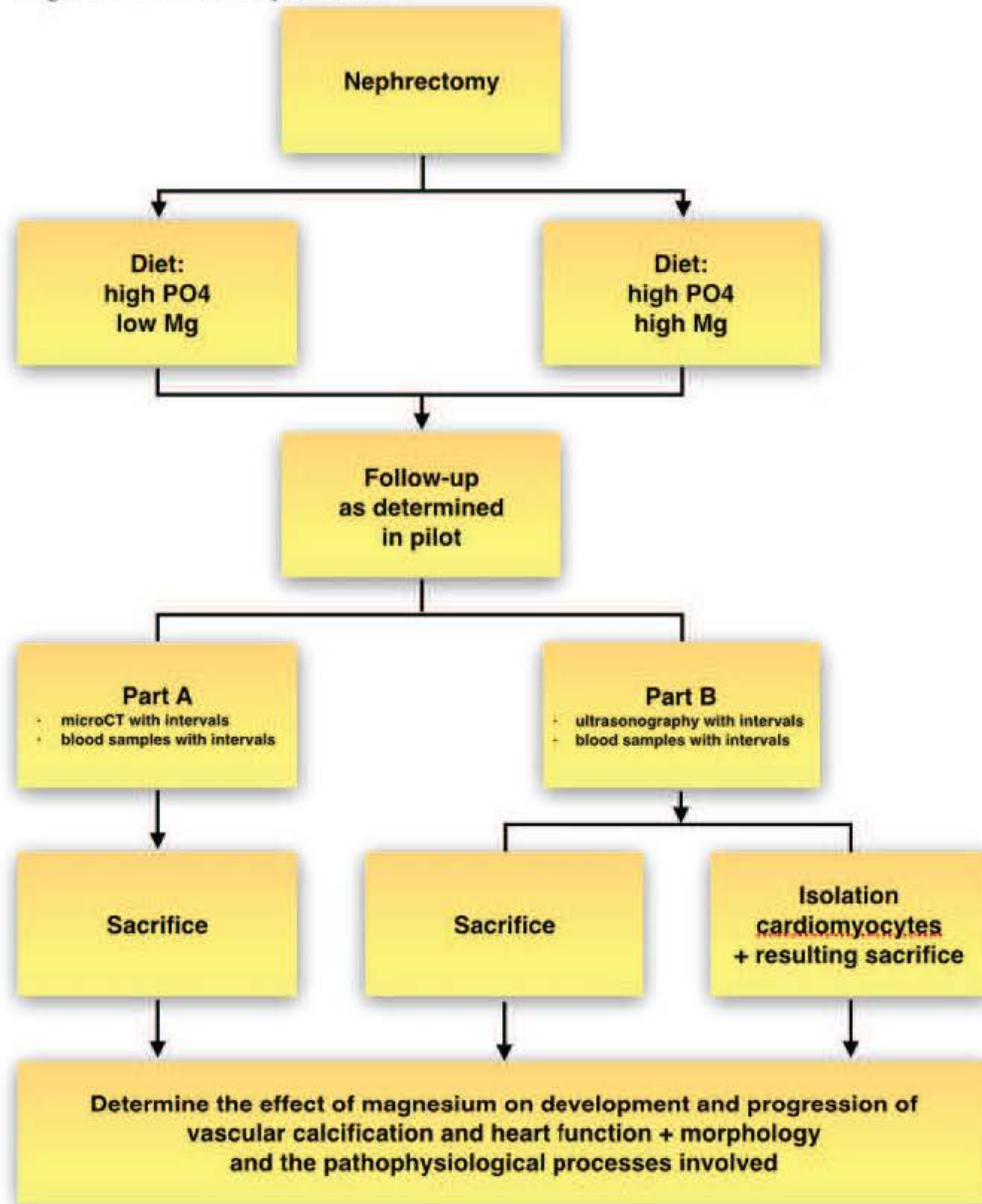


Figure 3. Main experiment



3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

To elucidate the role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal insufficiency, we will study these effects in an animal model of chronic kidney disease. As cardiovascular disease in CKD comprises vascular calcifications as well as cardiac remodeling and dysfunction, the experiments will investigate both the effects on the vasculature and the heart. The experiment will be conducted at two academic centers, thus combining available expertise and facilities of these centers. Part A focuses on vascular calcification and is conducted at the Radboud university medical center. At this center, micro-CT facility and expertise is available that enables us to visualize vascular calcification at different time points during follow-up so that effects on progression of calcification can be studied. Part B focuses on cardiac remodeling and dysfunction and is conducted at the VU medical center. This center is experienced in cardiac ultrasonography, cardiac research and isolation and analysis of cardiomyocytes from rat hearts. It is only possible to perform all parts of the experiment by locating the parts at two academic centers. Micro-CT is only available at the Radboudumc and cannot be transported to the VUMC. Isolation of primary cardiomyocytes requires equipment and a large training effort to enable well-running procedures performed by an experienced team and can therefore not be implemented at the Radboudumc for this project. By combining these parts, the effects of magnesium on both the vascular and cardiac problems that occur in CKD, can be investigated. The results of both parts can be linked together further, by analysis of the organs after sacrifice: in the rats from part A (calcification) the cardiac effects can be examined in the heart, and in the rats from part B (focusses on the heart) the arteries can be examined for vascular calcification.

Before proceeding to the main experiments, pilots will be performed to determine significant and tolerable modulations of dietary magnesium, and optimize the model of CKD with associated calcifications and its time-line. The results of the pilots are essential milestones to optimize study set-up of the main experiment. The pilot with different magnesium diets will be performed first, so that for the pilot with the nephrectomy model the optimal dietary magnesium content is known. Milestones and selection points are visualized in figure 1 to 3 in paragraph 3.4.2.

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	Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function

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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In a surgical procedure, the volume of vital kidney tissue is reduced, which results in impaired renal function and results in an (already established) animal model for chronic kidney disease. An increased dietary phosphate content post-nephrectomy, will induce development of vascular calcifications as is seen in human chronic kidney disease. This will provide a model of CKD with the associated complications on the vasculature and heart. Using this model, we can study the effects of supplemental magnesium (provided in the diet) on the development and progression of vascular calcification and cardiac remodeling and dysfunction.

The objectives are to answer the following research questions:

Part A (calcification):

Objective 1. Does a high dietary magnesium decrease the occurrence of vascular calcification in CKD?

Objective 2. Does a high dietary magnesium retard initiation and progression of vascular calcification in CKD?

Objective 3. What is the molecular and genetic background of magnesium-related protection against vascular calcification?

Part B:

Objective 4. Does a high dietary magnesium decrease the occurrence and retard initiation and progression of cardiac remodeling (like hypertrophy and fibrosis) and cardiac dysfunction in CKD?

Objective 5. What is the molecular and genetic background of magnesium-related cardiac protection?

Primary outcome parameters to measure the effects in this study are:

- vascular calcification assessed by colorimetric measurements of calcium content in vascular tissue. *(for objective 1)*
- cardiac hypertrophy expressed as cardiac mass relative to body weight. *(for objective 4)*

Secondary outcome parameters are:

- vascular calcification assessed during follow-up by microCT, and in vascular tissue by stainings. *(for objective 1 and 2)*

- cardiac remodeling assessed with echocardiography (parameters include ventricular wall thickness; left ventricular mass index) and with histology of heart tissue (parameters include wall thickness and fibrosis). (*for objective 4*)
- cardiac dysfunction assessed with echocardiography (parameters include left ventricular ejection fraction and measures of diastolic dysfunction) (*for objective 4*)
- expression of genes and proteins involved in the calcification process (*for objective 3*) and cardiac remodeling (*for objective 5*)

Other parameters include:

- parameters of kidney function (kreatinine, ureum in plasma) to validate the model of impaired kidney function
- plasma magnesium to validate the effect of modulation of dietary magnesium

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

Pilot: magnesium diets:

To determine the optimal low and high dietary magnesium content for the main experiments, in a pilot study, the rats will be divided in different groups that receive diets with either a low (0.05%), normal (0.22%) or high (0.48%) dietary magnesium for 2 weeks. The normal dietary magnesium is included so that we can see if the low and high dietary magnesium exert effects on plasma magnesium levels compared to the normal diet. Blood samples are taken from the tail vein with use of a restrainer and with intervals of at least 1 week (=maximal 3 samples). We expect the low (0.05%) dietary magnesium to be well tolerated, since this magnesium content is recommended for rat diets by the American Institute for Nutrition. We expect to achieve effect on plasma magnesium within 2 weeks. Therefore, follow-up will initially be 2 weeks in this pilot. If the diets do not effectively modulate plasma magnesium, or are not tolerated (cause symptoms of hypo- or hypermagnesemia or unforeseen mortality, as described in paragraph I), the pilot will be expanded using different dietary magnesium content or extended follow-up. In the expanded pilot, follow-up will be maximal 12 weeks and maximal 8 blood samples will be performed with intervals of at least 1 week.

Pilot: nephrectomy model:

In a surgical procedure under general anaesthesia, functional kidney tissue is reduced. Initially, this reduction will be 5/6 of total kidney tissue. First, the left kidney is exposed and decapsulated and one or more branches of the left renal artery are ligated to induce infarction of 2/3 of this kidney. Second, the right kidney is exposed, decapsulated, and after ligation of the hilar structures (artery, vein and ureter) removed in total in the same procedure. The surgery will be performed under general anaesthesia, including treatment with narcotics and analgesics, according to standard and

validated protocols used within our animal facility. This protocol also covers analgesia during post-surgical recovery. The animals receive a phosphate enriched diet (1.2%) with a low magnesium content as optimized in the preceding pilot study that determined the optimal magnesium diets. To determine development and progression of vascular calcification, micro-CT scans are performed under anaesthesia with intervals of at least 1 week and maximal 8 scans per animal. Maximal 8 blood samples will be collected from the tail artery with intervals of at least 1 week, for measurements of kidney function. At the end of the study, the rats will be sacrificed under general anaesthesia for analysis of organs and tissue. Initially follow-up (including dietary intervention) after nephrectomy will be 12 weeks.

If the model appears not to be representative, the pilot can be repeated once after adaption of protocols based on results of the pilots. In case of ineffective development of vascular calcification, follow-up will be extended to maximal 16 weeks. Initially we will perform 5/6-nephrectomy since combined with a high phosphate diet this is the established model for chronic kidney disease with associated vascular calcification in literature. However, in case of high animal loss combined with severe renal impairment (rise of kreatinine substantially above 2 times baseline), nephrectomy can be reduced up to 3/4 of kidney volume. In the repeated pilot nephrectomy will be minimal 3/4 and maximal 5/6 of vital kidney volume.

Main experiment

Rats are nephrectomised as validated in the pilot. Starting from this time on, the animals will receive a phosphate enriched diet (1.2%) with either a low or high magnesium content (as optimized in the pilot) until the end of the experiment.

Part A of main experiment

In this part, micro-CT scan are performed with intervals of at least one week and maximal 8 scans to determine moment of initiation, severity and progression of vascular calcification during follow-up. Blood samples will be collected at intervals of at least one week and maximal 3 times to confirm effective reduction of kidney function and determine plasma magnesium values. Duration of follow-up is as optimized in the pilot of the nephrectomy model and will be maximal 16 weeks. Halfway follow-up time, part of the animals will be housed in metabolic cages for collection of urine to measure electrolyte excretion. At the end of the experiments the animals are sacrificed under general anaesthesia and organs and tissue are collected for further analysis.

Part B of main experiment

In this part, echocardiography is performed with intervals of at least one week and maximal 8 times to determine the initiation, severity and progression of cardiac remodelling and dysfunction. Blood samples will be collected at intervals of at least one week and maximal 3 times to confirm effective reduction of kidney function, and determine plasma magnesium values and parameters of cardiac dysfunction (like ANP, BNP). Duration of

follow-up is as optimized in the pilot of the nephrectomy model and will be maximal 16 weeks. For isolation of vital cardiomyocytes using the Langendorff heart preparation, from part of the animals the heart is excised from the living animal after applying adequate anaesthesia. The diaphragm is opened via abdominal incision to expose the thoracic cavity, after which the thoracic cavity is opened by reflecting the thoracic cage upwards after bilateral incision of the thorax. The heart is excised by cutting the aorta, vena cava and pulmonary veins. This procedure will result in abrupt termination of circulation resulting in death. The other animals are sacrificed at the end of the experiment by means of a standard procedure for euthanasia under general anaesthesia. From all animals, organs and tissues are collected for further analysis.

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

In the pilot study for modulation of magnesium diets, a small number of animals will be used to test if the diets are tolerated and if this induces a sufficient effect on plasma magnesium levels. There are no available data on plasma magnesium levels in 5/6-nephrectomized rats. Mean plasma magnesium level in literature is $0.75 \text{ mmol/mL} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ in healthy Sprague-Dawley rats on a 0.05% magnesium diet.(1) A sufficient increase is defined as a rise in plasma magnesium concentration of 0.1 mmol/L , since in clinical observational studies differences of this magnitude were associated with improved outcome. Based on these data and definitions, and setting significance level at 5% ($\alpha=0.05$) and a power of 80% ($\beta=0.80$), the estimated number of animals is 3 per group. For the three diet groups this will be 9 animals in total. If the results give indication for evaluation of different magnesium diets, the pilot will be extended and 18 rats in total can be required.

In the pilot study for validation and characterization of the nephrectomy model with vascular calcification, also the smallest possible number of animals will be used. As is characteristic for a pilot study, detailed information for sample size calculations (for determination of progression and timeline of calcification) is not available in literature. We assume 3 animals would be an appropriate number to study the timeline of vascular calcification. On average, 60% of successfully 5/6-nephrectomized animals on a high phosphate diet develop vascular calcification.(2-4) Based on this, the required number of successfully 5/6-nephrectomized rats in the experiment would be 5 ($3 / 0.6 = 5$).

From previous research in multiple research lines in the VUMC we know that success ratio for the nephrectomy is 80%. For this model, that is an acceptable result. Due to anatomical differences between animals and the complexity of the surgical procedure, unfortunately it has not been possible to achieve a higher success ratio. Mortality in literature after 5/6-nephrectomy in rats on a high phosphate diet was 30-46% in studies that mentioned mortality,(3, 5, 6) but other studies did not describe mortality.(2, 4, 7-10) Based on a success ratio of 70-80% of the surgical procedure, a compensation of 30% is required when this model is used. This results in 8 animals needed for this pilot study ($5 / 0.7 = 7,14 = 8$ animals). If the results of the pilot give indication for adaptation of the model, the pilot study will be expanded and 16 rats in total will be required for the pilot of the

nephrectomy model. To ensure that there are enough animals for the pilot study, 3 extra animals are added to this calculation for the transfer of nephrectomy skills from the animal care facility of the VUmc to the Radboudumc, so 19 rats in total can be required for this pilot study.

For the main experiments in part A, the sample size calculation is based on the primary outcome vascular calcification determined with colorimetric quantification of calcium content. Based on literature, in 5/6-nephrectomized Sprague-Dawley rats on a high phosphate diet we expect a calcium content of $1.8 \text{ ug / mg} \pm 0.3 \text{ ug / mg}$ dry weight in this group (including both the rats that developed and the rats that did not develop vascular calcification).⁽⁹⁾ We consider a 15% decline of calcium content to 1.5 ug / mg dry weight in the group with the high magnesium diet a relevant reduction. Setting significance level at 5% ($\alpha=0.05$) and with a power of 80% ($\beta= 0.80$), the estimated number of animals is 16 per group. Including the compensation of 30% for success ratio of the surgery (as described above) the number of animals per group is 23 ($16 / 0.7 = 22.86 = 23$ animals). For the groups with low and high magnesium diets, the total number is 46 animals.

For the main experiments in part B, sample size calculation is based on the primary outcome heart weight, expressed as cardiac mass relative to body weight. Heart to body weight ratio in Sprague-Dawley rats 12 weeks after nephrectomy is 5.8 mg/g in literature, with a standard deviation of 0.9 mg/g .⁽¹¹⁾ We consider a 20% decline of heart to body weight ratio in the high magnesium group relevant. Based on these values and setting significance level at 5% ($\alpha=0.05$) and with a power of 80% ($\beta= 0.80$), the estimated number of animals is 9 per group. Additionally, to be able to perform the in vitro experiments, we need four animals per group for isolation of vital cardiomyocytes. It is not possible to examine the other cardiac outcome parameters in the animals that are used for isolation of cardiomyocytes because the entire heart will be used in this procedure. Including the compensation of 30% for success ratio of the surgery (as described above) the number of animals per group is 19 ($(9+4) / 0.7 = 18.57 = 19$ animals). For the groups with low and high magnesium diets, the total number needed is 38 animals in this part of the study.

The sample size calculations for the main experiments will be re-evaluated after the pilot studies. If less animals can be used based on the results of the pilot studies, the numbers of animals will be decreased accordingly.

Table 1. Experimental groups and number of animals required.

	Magnesium diet			Renal status		Number of animals	Discomfort level
	Low	Normal	High	Normal	Nephrectomy		
Pilot study magnesium diets	X			X		6	mild
		X		X		6	mild
			X	X		6	mild
Pilot study nephrectomy model	X				X	19	moderate
Main experiment part A	X				X	23	moderate
			X		X	23	moderate
Main experiment part B	X				X	19	moderate
			X		X	19	moderate
Total						121	

1. Takemoto S, Yamamoto A, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T. Magnesium deficiency induces the emergence of mast cells in the liver of rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2013;59(6):560-3.
2. Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, Saji F, Mune S, Kunimoto K, et al. Reduced expression of perlecan in the aorta of secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification. *Renal failure*. 2010;32(2):214-23.
3. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):911-6.
4. Yao L, Sun YT, Sun W, Xu TH, Ren C, Fan X, et al. High phosphorus level leads to aortic calcification via beta-catenin in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2015;41(1):28-36.
5. Wu-Wong JR, Chen YW, Wong JT, Wessale JL. Preclinical studies of VS-505: a non-absorbable highly effective phosphate binder. *British journal of pharmacology*. 2016;173(14):2278-89.
6. Eraranta A, Tormanen S, Koobi P, Vehmas TI, Lakkisto P, Tikkanen I, et al. Phosphate binding reduces aortic angiotensin-converting enzyme and enhances nitric oxide bioactivity in experimental renal insufficiency. *Am J Nephrol*. 2014;39(5):400-8.
7. Du Y, Wang Y, Wang L, Liu B, Tian Q, Liu CJ, et al. Cartilage oligomeric matrix protein inhibits vascular smooth muscle calcification by interacting with bone morphogenetic protein-2. *Circulation research*. 2011;108(8):917-28.

8. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. BMC nephrology. 2014;15:69.
9. Martin-Pardillos A, Sosa C, Millan A, Sorribas V. Effect of water fluoridation on the development of medial vascular calcification in uremic rats. Toxicology. 2014;318:40-50.
10. Scheiber D, Veulemans V, Horn P, Chatrou ML, Potthoff SA, Kelm M, et al. High-Dose Menaquinone-7 Supplementation Reduces Cardiovascular Calcification in a Murine Model of Extraosseous Calcification. Nutrients. 2015;7(8):6991-7011.
11. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Gross ML. Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotaly nephrectomized rats. Nephrol Dial Transplant. 2009;24(3):778-87.

B. The animals

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

For the experiments, we plan to use adult Sprague-Dawley rats of both sexes, from an experienced, qualified and controlled supplier. These rats are widely used in renal and physiological research. The nephrectomy model with associated calcification is a well-established model in literature especially in these rats. This provides opportunity to compare the results of our experiments with research of others. In the VUmc, we have vast experience with research involving rats and 5/6- and 3/4-nephrectomies. Moreover, available research has shown that dietary magnesium intake can effectively influence plasma magnesium levels in rats. (1,2) The estimated total number of animals required is 121, as described in the previous paragraph.

1. Zelt JG, McCabe KM, Svajger B, Barron H, Laverty K, Holden RM, et al. Magnesium Modifies the Impact of Calcitriol Treatment on Vascular Calcification in Experimental Chronic Kidney Disease. J Pharmacol Exp Ther. 2015;355(3):451-62.
2. Takemoto S, Yamamoto A, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T. Magnesium deficiency induces the emergence of mast cells in the liver of rats. Journal of nutritional science and vitaminology. 2013;59(6):560-3.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Commercial supplier	121	Adult

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.

C. Re-use

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

In a rat model of CKD, the role of magnesium can be investigated in the context of the complex interactions between chronic kidney disease and the cardiovascular system. These experiments can provide a link between the results of clinical observational studies and *in vitro* experiments. The simple *in vitro* conditions of vascular calcification in vascular smooth muscle cells or effects on cardiomyocyte cell lines, can provide valuable additional information on the molecular level, and for this purpose we can isolate primary cardiomyocytes from the rats, that can be used for *in vitro* studies, instead of available cardiomyocyte cell lines that have lost many of the cardiomyocyte specific characteristics. However, these *in vitro* studies cannot reproduce all complex interactions and regulatory mechanisms encountered *in vivo*. Therefore, there is no substitute for animal studies that can take into account this complicated interplay of organ systems, in which regulatory mechanisms including hormonal regulations play a crucial role. Moreover, these interactions cannot be mimicked in a lower animal species. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in human, including analysis of organs and tissue, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address.

Reduction

A sample size calculation will be performed to determine the amount of animals needed, to be able to observe if a difference between the groups

exists that we have defined as relevant, with a defined statistical significance and power. These calculations are previously described in section A3 “statistical methods”.

Also, a pilot study will be performed to provide data on the effect of dietary magnesium content on plasma magnesium levels and development of adverse effects, so that the number of animals suffering from extremely low or high magnesium levels can be limited. Based on the calculations, the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

The nephrectomy model is a well-established model of CKD, and if combined with a high phosphate diet in rats it is a well-established model of CKD-associated vascular calcification also. In our centers, experience with this procedure is available. The experimental design ensures that the experiments will be conducted in such a way that there are no unnecessary harmful effects on animal welfare. Pilot experiments will provide information to optimize follow-up time and the interval of measurements, so that the animals will be no longer and no more than necessary exposed to the interventions and procedures. Pilot studies and extensive study of available research, will limit the risk of severe unexpected side-effects during the experiments. To limit discomfort, the rats will be housed together in groups as in their natural environment, and with free access to food and water. Only a small number of rats will be housed solitary in metabolic cages for a short duration (maximal 24 hours) to collect urine to measure electrolyte excretion. After nephrectomy, the feeding will be mixed with water and placed in the cages to minimize the effort needed for eating. Post-surgery, the animals will be checked daily to ensure that recovery develops as expected. Follow-up interventions other than the dietary modulation will only be performed after a minimum of 7 days after surgery, to prevent interference with recovery. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, rats will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. In addition, prior to imaging procedures, surgery and sacrifice, the animals will be anaesthetized, and intervals in-between imaging procedures will be at least one week.

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

Refined methods are used, as described before in the concerning paragraph, to limit the risk of adverse effects on animal welfare. Despite this, adverse effects on animal welfare may occur. Therefore, the animals will be closely monitored to ensure timely recognition of declined wellbeing. In the post-operative phase, daily monitoring is performed to detect animal inconvenience at an early stage and act accordingly to minimize suffering. Additional medication for pain relief will be administered according to routine procedures. Using our standardized scoring methods, various parameters of animal welfare, including post-operative recovery and pain relief, physical activity, appearance and body weight, are daily monitored

during the experiments. Extensive weight loss, or pain and suffering that cannot be solved within reasonable time and thus will exceed the predicted discomfort level, will result in implementation of the human endpoint. No other effects on the environment are expected.

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.

Not applicable

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.

Housing will be according to regulations and standard procedures. The animals will be housed in groups as is according to their natural environment. Only if post-surgical recovery in the neprectomy-model pilot study appears to be compromised by other animals causing damage to stiches, the animals can be housed solitary overnight after surgery. In previous experiments with nephrectomy in rats performed in the VUMC, animals were routinely solitary housed overnight after surgery to prevent damage to stiches caused by other animals. However, as was also mentioned by the animal welfare officer of the Radboudumc, grouped housing is preferable wherever possible to reduce stress to the animals. Therefore, the animals will be housed in groups in the nephectomy pilot initially and post-surgical individual housing will be implemented for the further experiments only if damage to stiches occurs and is evidently caused by other animals. During part A of the experiment, some of the animals (5 per group, 10 animals in total) will be housed in metabolic cages for a short time (maximal 24 hours) so that we are able to measure electrolyte excretion. In this way, we

can determine if the effect of the high phosphate diet on phosphate metabolism is the same in the group with the high magnesium diet and the group with the low magnesium diet. If there would be a difference between the groups, we can then distinguish effects of phosphate metabolism and magnesium diet in the data analysis.

Diets will be adapted to create a study set-up for the specific research aims. The rats will receive a synthetic diet with high phosphate content and either low or high magnesium content. The high phosphate diet is needed to facilitate the development of vascular calcifications, as known from previous nephrectomy rat models of CKD-induced vascular calcification that are described in literature.(see background section) Different magnesium contents are used since aim of the project is to study the effects of magnesium on the development and progression of vascular calcification and cardiac dysfunction and hypertrophy.

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

The nephrectomy will be performed under general anaesthesia, including treatment with narcotics and analgesics, according to standard and validated protocols used within our animal facility. This protocol also covers analgesia during post-surgical recovery. All procedures will be performed by qualified and experienced personnel.

Anaesthesia will also be applied for imaging procedures (ultrasonography and micro-CT), to reduce distress and enable imaging without movement artefacts. These imaging procedures are non-invasive and do not cause pain.

To reduce pain and distress from venous punctures for blood sampling, these punctures will be performed during periods of anaesthesia at the time of the imaging procedures wherever possible. Venous punctures with use of a restrainer will only be performed if blood sampling is necessary at other time points.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The nephrectomy surgery will result in reduced renal function. If only a small volume of kidney tissue remains after the operation, this can result in full-blown kidney failure with associated effects on serum composition, hemoglobin levels and mineral and bone metabolism, which could have adverse effects on welfare. In previous studies in the VUMC, we did not experience side effects of decreased renal function. Apparently, the remaining kidney function is sufficient for animals to survive without compromising their welfare. By providing a diet with high phosphate content, development of cardiovascular disease is promoted, which may become symptomatic and reduce animal welfare, but early stages of calcification can be without effects on wellbeing. Cardiovascular disease is the subject of study and therefore inevitable in the experiments.

Mortality risk is increased as a result of surgery associated mortality and CKD-associated mortality. Reported mortality risk in the 5/6-nephrectomy model in rats with a dietary phosphate above 1%, was 30-46% in studies that mentioned mortality.(1-3) Other studies did not report mortality.(4-9) From previous research in multiple lines of research in the VUMC we know that we can achieve a success ratio for the nephrectomy of 80%. For this model, that is an acceptable result. Due to anatomical differences between animals and the complexity of the surgical procedure, unfortunately it has not been possible to achieve a higher success rate.

For analgesia in the peri-operative period, opiates are used since NSAIDs are contra-indicated because of their side-effects that can compromise the remaining kidney function. Possible side-effects of opiates are nausea and constipation that can be minimized by optimal dosing.

The intervention in dietary magnesium content could cause adverse effects, only if resulting in severe hypomagnesemia or hypermagnesemia. Potential symptoms of hypomagnesemia include skin lesions (dermatosis of hypomagnesaemic rats), neuromuscular manifestations (eg. muscle cramps, convulsions, weakness), cardiovascular manifestations (eg. cardiac arrhythmias, hypertension), bone abnormalities (decreased skeletal growth and increased skeletal fragility) and mortality due to the mentioned disorders. Severe hypermagnesemia could potentially cause neuromuscular effects (eg. muscle weakness), cardiovascular effects (eg. hypotension, bradycardia, complete heart block and death), and bone abnormalities (osteodystrophy). No discomfort is expected in moderate hypo- or hypermagnesemia.

Housing in metabolic cages can cause stress. In the experiment the duration of housing in metabolic cages is limited to maximal 24 hours.

Echocardiography and micro-CT are non-invasive techniques that are not expected to cause side effects other than discomfort during the procedure if it would not be performed under anaesthesia. Radiation exposure with micro-CT scans is limited and does not cause adverse effects if appropriately dosed: X-ray loading to the animal is <1Gy per scan.

Venous punctures for blood collection, might cause hematoma. The volume and frequency of blood collection will be appropriate so that blood collection does not cause hypovolemia or anemia.

1. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):911-6.
2. Eraranta A, Tormanen S, Koobi P, Vehmas TI, Lakkisto P, Tikkanen I, et al. Phosphate binding reduces aortic angiotensin-converting enzyme and enhances nitric oxide bioactivity in experimental renal insufficiency. *Am J Nephrol*. 2014;39(5):400-8.
3. Wu-Wong JR, Chen YW, Wong JT, Wessale JL. Preclinical studies of VS-505: a non-absorbable highly effective phosphate binder. *British journal of pharmacology*. 2016;173(14):2278-89.
4. Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, Saji F, Mune S, Kunimoto K, et al. Reduced expression of perlecan in the aorta of secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification. *Renal failure*. 2010;32(2):214-23.

5. Yao L, Sun YT, Sun W, Xu TH, Ren C, Fan X, et al. High phosphorus level leads to aortic calcification via beta-catenin in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2015;41(1):28-36.
6. Du Y, Wang Y, Wang L, Liu B, Tian Q, Liu CJ, et al. Cartilage oligomeric matrix protein inhibits vascular smooth muscle calcification by interacting with bone morphogenetic protein-2. *Circulation research*. 2011;108(8):917-28.
7. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC nephrology*. 2014;15:69.
8. Martin-Pardillos A, Sosa C, Millan A, Sorribas V. Effect of water fluoridation on the development of medial vascular calcification in uremic rats. *Toxicology*. 2014;318:40-50.
9. Scheiber D, Veulemans V, Horn P, Chatrou ML, Potthoff SA, Kelm M, et al. High-Dose Menaquinone-7 Supplementation Reduces Cardiovascular Calcification in a Murine Model of Extraosseous Calcification. *Nutrients*. 2015;7(8):6991-7011.

Explain why these effects may emerge.

The causes of the effects were explained in the previous section. Summarized:

- Nephrectomy: CKD with associated disorders, mortality
- Analgesia: nausea, constipation
- Modulations dietary magnesium: symptomatic hypo- or hypermagnesemia
- Metabolic cages: stress
- Imaging procedures: no effects if appropriately performed
- Venous puncture: hematoma

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

Nephrectomy

In the VUmc via extensive training of the technical skills and the method to reduce kidney volume, a broad experience is gained to perform the nephrectomy procedure in rats in the best possible way. Use of precise instruments and a surgical microscope provide tools for optimal performance. In the animal facility of the Radboudumc, there is also experience with nephrectomy in mice. To ensure that all personnel is well skilled in performing

the nephrectomy specifically in rats, personnel of the VUMC will share their experience and the technical skills with the personnel of the Radboudumc and provide training. Only personnel that is well-skilled, will perform the procedure by themselves for experimental purposes.

In the post-operative recovery phase, the animals are closely monitored to make sure that adverse effects on animal welfare are recognized in an early stage and can be acted on accordingly to solve the underlying problem, or implement a human endpoint as appropriate (as described in the paragraph concerning human endpoints).

Analgesia

Opiates are appropriately dosed according to the protocol that is used for the nephrectomy procedure in the VUmc animal care facility and was made with advice from the veterinarian. Appropriate dosing minimizes nausea with increased chewing, and constipation. No sawdust is used on the floor of the cages, so that in case of increased chewing no constipation is caused by eating sawdust.

Modulations dietary magnesium

In a pilot experiment, it will be evaluated which high and low magnesium concentrations are tolerated. During this pilot experiment the rats will be closely monitored visually and by measurement of serum magnesium concentrations. Rats with symptomatic hypo- or hypermagnesaemia, will be excluded in a timely manner. The results of this pilot experiment will enable us to perform the main study with low and high magnesium concentrations that are generally not causing severe symptoms.

Housing in metabolic cages

Metabolic cages will be used for part of the animals of experiment A and for a short time only, maximal 24 hours. To limit stress from solitary housing, the cages will be placed in a room with other rat cages. Housing in metabolic cages will be performed halfway follow-up time and not shortly before or after other interventions.

Imaging procedures: micro-CT and echocardiography

To reduce discomfort (and facilitate visualization without movement artefacts), anaesthesia will be used for these procedures and will be conducted by properly educated and experienced personnel. To reduce cumulative burden of micro-CT scans, intervals in between micro-CT scans will be at least 1 week.

Venous punctures

As stated previously, volume and frequency of blood collection will be appropriate so that no hypovolemia or anemia is caused. The strategy concerning pain relief was previously mentioned in the section on this topic. The incidence of hematomas is reduced by applying the appropriate technique.

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.

During surgery, individual anatomic variation between animals may result in technical setback in optimal procedure results. These technical difficulties may result in implementation of the humane endpoint, meaning the animal will not recover from anaesthesia and thus no increment in the level of discomfort.

Post-surgery, scoring of specific parameters as described in details below that cannot be resolved and therefore exceed the maximum predicted discomfort level within this project (moderate) will result in implementation of the human endpoint. For the parameter body weight, the human endpoint will be implemented if a decrease of 20% is reached. In these situations, the animal will be sacrificed prematurely according to the recommended methods (as mentioned in section L). In case of doubt, advice of the animal welfare officer will be asked, to provide guidance for follow-up actions.

Setup of the parameters is as follows (these parameters are based on our extensive experience with comparable models and act as a standardized scoring method for individual animal inconvenience):

Bodyweight: no more than 20% loss allowed within a few days compared to top body weight (during recovery the bodyweight during surgery will be used for reference, further on the experiment the top reached bodyweight will count as reference).

Activity scored as active [0], little inactivity [1] or total inactivity/immobility [2].

Appearance scored as normal [0], disturbed fur [1], untended appearance (eyes/nose) [2] or abnormal pose (indication for pain or muscle cramps) [3].

Surgical recovery scored as fully recovered [0], wound closed but visible [1], (small) disturbed wound healing [2] or open wound [3].

The scientific endpoint cannot be achieved prematurely in this experimental set-up, so this is not an applicable reason for implementation of human endpoints during these animals procedures. If the scientific endpoint can no longer be achieved for any reason, implementation of a human endpoint will follow, meaning the nephrectomized rats will be sacrificed prematurely.

Indicate the likely incidence.

Based on previous experience in the VUMC we expect a success rate of the surgical nephrectomy procedure of 80%. From this previous research in different research projects in the VUMC, we know that animals with adverse outcome after surgery generally die spontaneously during surgery or from sudden death thereafter. We did not observe symptoms of decreased kidney function that resulted in a decline of welfare in the animals. As a consequence, implementation of human endpoints is expected to be required infrequently.

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).

Nephrectomy surgery under general anaesthesia: moderate (applicable to 85% of animals)

Synthetic diets with high phosphate: mild (applicable to 85% of animals)

Synthetic diet with low or high magnesium: mild (applicable to 95% of animals)

Housing in metabolic cages: mild (applicable to 8% of animals)

Blood sampling: mild (applicable to 100% of animals)

Micro-CT under general anaesthesia: mild (applicable to 54% of animals)

Cardiac ultrasonography under general anaesthesia: mild (applicable to 31% of animals)

Sacrifice under general anaesthesia: non-recovery (applicable to 100% of animals)

Overall maximum discomfort level: mild in 15% of animals, moderate in 85% of animals. (classifications for the individual experimental groups were shown in table 1 in paragraph 2A)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

☐ No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues and isolation of cardiomyocytes.

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.

For most of the rats, a standard method from the European guideline will be used as listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU, except for the 8 rats (7% of animals) from which cardiac cells will be isolated. For isolation of vital cardiomyocytes using the Langendorff heart preparation, the heart is excised from the living animal after applying adequate anaesthesia. The diaphragm is opened via abdominal incision to expose the thoracic cavity, after which the thoracic cavity is opened by reflecting the thoracic cage upwards after bilateral incision of the thorax. The heart is excised by cutting the aorta, vena cava and pulmonary veins. This procedure will result in abrupt termination of circulation resulting in death.

☐ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0096
2. Titel van het project: The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment
3. Titel van de NTS: Kan extra magnesium de ontwikkeling van problemen aan hart- en vaten bij chronische nierziekte verminderen?
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 17-01-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 21-02-2017, 04-04-2017, en 09-05-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 28-02-2017 tot 20-03-2017 en van 10-04-2017 tot 18-04-2017 en van 15-05-2017 tot 22-05-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 20-03-2017, 18-04-2017 en 22-04-2017
 - ☒ advies aan CCD: 16-06-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 28-02-2017
 - Datum antwoorden: 20-03-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Titel: Can additional magnesium reduce the development of cardiovascular complications in chronic kidney disease?

Project Proposal:

-3.1: De commissie mist een heldere uiteenzetting van de achtergronden van deze projectaanvraag. Er is kennelijk een omgekeerde relatie tussen Mg-gehalte in bloedplasma en het optreden van cardiovasculaire aandoeningen (door calcificaties of door een direct effect op de vaatspieren en het hart). Patiënten met slecht functionerende nieren hebben een hoger Mg-gehalte in het bloedplasma, maar desondanks toch een hoger risico op

cardiovasculaire aandoeningen. Onvoldoende onderbouwd blijft waarom de onderzoekers menen dat het verhogen van het (toch al hoge) Mg-gehalte in het bloedplasma middels Mg-suppletie zal leiden tot een vermindering van cardiovasculaire ziekte bij nierpatiënten. Heeft dit misschien te maken met het vergroten van de fractie vrije Mg-ionen ten opzichte van het totaal Mg-gehalte? In de achtergrond wordt niet uitgelegd uit welke componenten calcificaties bestaan en hoe zij ontstaan. Hierdoor is het ook onduidelijk hoe hypermagnesaemie calcificaties zou kunnen tegengaan. De commissie vermoedt dat Ca-ionen ook een belangrijke rol spelen, maar deze worden niet in samenhang met deze problematiek besproken. Aan het einde van de tweede alinea wordt vermeld dat een lage Mg-concentratie een risicofactor voor CKD is. CKD patiënten hebben toch juist een hoger Mg-gehalte in het bloedplasma? Bedoelden de onderzoekers hier CVD i.p.v. CKD?

Antwoord: Patiënten met slecht functionerende nieren hebben een verhoogd risico op cardiovasculaire ziekte. Bij deze mensen zijn veel risicofactoren aanwezig die het risico op cardiovasculaire ziekte verhogen. Dit zijn zowel de traditionele risicofactoren (net zoals in de algemene populatie) zoals hoge bloeddruk en hoog cholesterol, maar ook nierspecifieke risicofactoren zoals een hoge fosfaatconcentratie in het bloed en zoals u inderdaad terecht suggereert ook verhoogde calciumconcentratie in het bloed is een belangrijke risicofactor.

Bij dialysepatiënten (met dus eindstadium nierfalen) en ook bij mensen met vroegere stadia van nierziekte, is een associatie gevonden tussen een relatief hogere waarde (dus niet zozeer een waarde boven de referentiewaarde) van het magnesiumgehalte in het bloed en minder totale sterfte en minder sterfte aan hart- en vaatziekten. De optimale waarde voor de magnesiumconcentratie bij dialysepatiënten blijkt duidelijk hoger dan de in de algemene bevolking gemiddelde waarde en ook hoger dan de meest voorkomende waarde bij dialysepatiënten. Bovendien kan niet gesteld worden dat alle mensen met een verminderde nierfunctie (maar nog niet van dialyse afhankelijk) een verhoogde magnesiumwaarde in het bloed hebben. Bij minder ernstige stadia van nierinsufficiëntie kan het magnesiumgehalte binnen de waarden blijven die voor de algemene bevolking gelden als normaal. Aangezien het optimum voor mensen met een nierziekte dus hoger lijkt te liggen dan als normaal wordt beschouwd is er voor patiënten met een nierziekte een window-of-opportunity. Deze hogere optimale waarde is op meerdere manieren te verklaren en is de kern van onze hypothese. Het is mogelijk dat de optimale waarde voor iemand met een verminderde nierfunctie anders is dan voor gezonde personen, bijvoorbeeld door een veranderde binding aan andere moleculen in het bloed, veranderde balans tussen de verdeling van magnesium over de verschillende lichaamscompartimenten en veranderde hoeveelheden van andere elektrolyten (zoals calcium en fosfaat) die bijdragen aan ectopische calcificatie. In die situatie zou dus een hoger magnesium meer protectie kunnen bieden.

De wijze waarop een hoger magnesium cardiovasculaire ziekte tegen kan gaan is nog niet opgehelderd. Kijkend naar de biologische functies van magnesium, met een rol voor veel enzymreacties en beïnvloeding van passage van andere elektrolyten over de celmembranen, zijn veel beschermende mechanismen mogelijk, die verstoord zijn bij nierfalen. Specifiek voor vasculaire calcificatie zijn er meerdere mechanismen gesuggereerd. Vasculaire calcificatie bestaat uit componenten die vergelijkbaar zijn met bot en inderdaad is calcium daarbij ook een belangrijke component. Bij het proces van vasculaire calcificatie wordt er een extracellulaire matrix gevormd van eiwitten die ook in bot voorkomen, zoals een netwerk van collageen en osteonectin, waarin hydroxyapatiet (een mineraal van calcium en fosfaat, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) zich afzet, leidend tot een gecalcificeerde matrix. De botachtige matrixeiwitten worden uitgescheiden door gladde spiercellen uit de vaatwand die zijn gedifferentieerd tot een meer bot-achtig fenotype doordat zij bot-achtige genen tot expressie brengen. De veranderde genexpressie van deze gladde spiercellen kan ontstaan in respons op

een overmaat aan calcificatie stimulerende factoren waarbij een hoog fosfaatgehalte een belangrijke stimulans is. Het neerslaan van hydroxyapatiet in de extracellulaire matrix wordt bevorderd door matrix vesicles die worden uitgescheiden door de bot-achtige gladde spiercellen en rijk zijn aan calcium en fosfaat en enzymen bevatten. Bij een overmaat aan calcium, fosfaat en een tekort aan calcificatie remmende eiwitten (zoals MGP), vormen deze matrix vesicles een nidus voor de vorming van hydroxyapatiet kristallen, die vervolgens zich kunnen afzetten in de extracellulaire matrix.(1)

Het mechanisme waarop een hoger magnesiumgehalte dit proces remt is niet opgehelderd. Er zijn verschillende mechanismen gesuggereerd. Mogelijke mechanismen zijn een direct remmend effect van extracellulaire magnesiumionen op de vorming van hydroxyapatiet kristallen, remmen van calciumkanalen waardoor de overmatige calciuminflux in de gladde spiercellen afneemt, een effect via binding aan de calcium-sensing receptor gevolgd door een onbekend moleculair mechanisme waardoor calcificatie wordt geremd, of een effect van magnesium door intracellulair het calcificatieproces te remmen bijvoorbeeld door remming van de expressie van bot-achtige genen (via een nog onbekend moleculair mechanisme).(2)

Op basis van deze genoemde argumenten is onze hypothese dat een hoger magnesium in het dieet het optreden van cardiovasculaire aandoeningen kan verminderen. We hopen hiermee de achtergrond van de aanvraag voldoende te hebben verduidelijkt. In reactie op uw laatste vraag kunnen we inderdaad zeggen dat waar "risicofactor voor CKD" stond "risicofactor voor cardiovasculaire ziekte in CKD" werd bedoeld. We hebben dit aangepast.

1. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. Circulation research. 2011;109(6):697-711.

2. Massy ZA, Nistor I, Apetrii M, Brandenburg VM, Bover J, Evenepoel P, et al. Magnesium-based interventions for normal kidney function and chronic kidney disease. Magnes Res. 2016.

-3.1: Hebben de dieren in het beoogde (chirurgische) model met verminderde nierfunctie ook een verhoogd Mg-gehalte in het bloed? Wat gebeurt er met het Mg-gehalte in het bloed wanneer er een hoog of laag Mg-dieet wordt gegeven aan dieren met een slechte nierfunctie?

Antwoord: Het is bekend dat er bij eindstadium nierfalen een verhoging van de serum magnesiumspiegel kan optreden ten gevolge van een verminderde renale magnesiumexcretie. Daartegenover echter staat dat kaliumbeperkende dieetadviezen doorgaans ook leiden tot minder magnesium inname met het dieet, daar beide mineralen veel in de dezelfde dieetproducten voorkomen. De nierinsufficiëntie die in de experimenten na een succesvolle nefrectomieprocedure bij de ratten geïnduceerd wordt, is geen eindstadium van nierfalen. Uit ervaring in het VUMC met nefrectomie bij ratten weten we dat er bij deze dieren geen biologische neveneffecten van de verminderde nierfunctie werden gezien. Derhalve verwachten we niet dat de dieren in het chirurgisch model een verhoogde serum magnesium waarde zullen hebben.

In de pilot waarin de magnesium diëten worden getest, zal een hoog en een laag magnesium dieet worden geselecteerd dat verdragen wordt (geen ernstige hypo- of hypermagnesiëmie veroorzaakt) en waarbij het dieet met hoog magnesium een hoger serum magnesium tot gevolg heeft. Aangezien we in de pilot een "laag" magnesium dieet gebruiken dat de hoeveelheid magnesium bevat die voldoet aan de aanbevolen hoeveelheid volgens de Amerikaanse richtlijn voor rattenvoeding, verwachten we met dit dieet een normaal of in ieder geval niet ernstig verlaagd serum magnesium te zien. Bij de dieren met nefrectomie verwachten we een vergelijkbaar effect te zien, namelijk een normaal of in ieder geval niet ernstig verlaagd serum magnesium bij het "laag" magnesium dieet en een hogere serum magnesiumspiegel zonder ernstige hypermagnesiëmie bij het hoog magnesium dieet. Als er meer magnesium aanbod is, zoals bij het hoog magnesium dieet, kan de renale excretie

stijgen om dit hogere aanbod deels te compenseren. Theoretisch zou het kunnen dat de renale excretie van magnesium meer stijgt bij de dieren zonder nefrectomie dan bij de dieren met nefrectomie. Hierdoor zouden de dieren met nefrectomie dan een iets hoger serum magnesium kunnen krijgen bij het hoog magnesium dieet, dan de dieren zonder nefrectomie. Echter, we verwachten we dat dit verschil tussen dieren met en zonder nefrectomie gering zal zijn en het dieet dus ook bij de dieren met nefrectomie geen ernstige hypermagnesiëmie zal veroorzaken.

-3.1: Wanneer er heel weinig magnesium beschikbaar is, dan zal de Mg-huishouding in de darm veranderen om zoveel mogelijk magnesium in het lichaam te krijgen/houden. Een beschrijving van dit mechanisme en eventuele implicaties voor de experimenten ontbreken. Antwoord: De relatieve opname van magnesium in de darm zal inderdaad worden aangepast aan het aanbod. Bij minder aanbod is er relatief meer opname, bij veel aanbod is er relatief minder opname en er is ook een limiet aan de totale opnamecapaciteit. Hierdoor is de hoogte van het dieet niet 1 op 1 te vertalen naar de magnesiumopname in de darm. Echter, er is een ook een limiet aan de mogelijkheid tot aanpassing van de relatieve opname waardoor er wel degelijk een associatie is tussen magnesium inname via het dieet en de concentratie in het bloed. Uit eerdere studies is bekend dat het mogelijk is om met variatie van het magnesiumaanbod in het dieet een variatie van de magnesiumconcentratie in het bloed te bereiken bij ratten. Het doel van de experimenten is niet om de relatie tussen de exacte hoeveelheid opgenomen magnesium en het optreden van cardiovasculaire complicaties te kwantificeren, maar om vast te stellen of we door het ophogen van magnesium in het dieet het optreden van cardiovasculaire complicaties kunnen verminderen. Een verschil in relatieve opname bij een hoog of laag magnesium dieet staat het beantwoorden van de vraag dus niet in de weg mits het verschil in relatieve opname niet leidt tot een netto identieke absorptie van magnesium bij de verschillende diëten. Dit laatste zal worden ondervangen met de pilotstudie waarin het effect van verschillen in magnesium-content van het diëet op de plasma magnesium spiegel zal worden geëvalueerd.

-3.4.2: Kan het effect van Mg²⁺ op calcificaties in bloedvaten en op hartcellen niet in dezelfde dieren onderzocht worden? Wellicht kunnen de experimenten op één locatie plaatsvinden: hierdoor wordt de helft van het aantal dieren uitgespaard. Doelstellingen 4 en 5 kunnen in principe met dezelfde dieren behaald worden als doelstellingen 1,2, en 3. Antwoord: Alvorens tot het besluit te komen om de experimenten op 2 locaties uit te willen voeren, hebben we de mogelijkheden op de 2 locaties uitgebreid geëxploreerd. Hieruit hebben we geconcludeerd dat het alleen mogelijk is om de beschreven experimenten uit te voeren door de lokale faciliteiten en beschikbare expertise en infrastructuur van Radboudumc en VUMC te combineren.

Voor het vervaardigen van micro-CT is de apparatuur en expertise aanwezig in Nijmegen. Deze apparatuur is locatie gebonden en niet transporteerbaar naar het VUMC, waar deze apparatuur niet aanwezig is. Het is dus alleen mogelijk om het tijdsbeloop van calcificatie te beoordelen met micro-CT als we deze experimenten in Nijmegen uitvoeren.

Voor het isoleren van primaire cardiomyocyten uit het rattenhart zijn apparatuur, logistiek en expertise in het VUMC aanwezig. Deze procedure vereist niet alleen specifieke apparatuur, maar ook een grote deskundigheid van het personeel, welke met een aanzienlijke leercurve gepaard gaat. Opbouwen van deze expertise zou ook van invloed zijn op het aantal proefdieren. In het VUMC wordt deze procedure zeer geregeld uitgevoerd waardoor uitgebreide ervaring aanwezig is en de procedure geroutineerd uitgevoerd kan worden. In Nijmegen beschikken we niet over de apparatuur en expertise voor het uitvoeren van deze procedure. Gezien de benodigde apparatuur en leercurve die met de procedure gepaard gaat, is het niet redelijkerwijs haalbaar om deze procedure in Nijmegen te implementeren.

Daarnaast moet voor het isoleren van vitale cardiomyocyten snel gehandeld worden gebruik makend van de Langendorff set-up en wordt bij excisie van het hart een stukje van de aorta meegenomen, waardoor het moeilijk is om volledig vaatmateriaal van de aorta ascendens vanuit hetzelfde dier te krijgen. Verder is in het VUMC bij de afdeling waarmee wordt samengewerkt eveneens uitgebreide ervaring met echocardiografie bij ratten, wat dus op deze locatie in hetzelfde experiment kan worden gecombineerd.

-3.4.2: Direct na de nefrectomie krijgen de dieren een dieet met hoog fosfaat en veel of weinig Magnesium (beschreven in DAP1). In doelstelling 2 (onderdeel 3.2) staat het effect van Magnesium op gevestigde calcificaties centraal. Hoe kan dit onderzocht worden met een experiment waarin het hoge Mg-dieet tegelijk met het hoog fosfaat dieet gestart wordt? Op dat moment zijn er immers nog geen calcificaties.

Antwoord: In het experiment willen we zowel onderzoeken of een hoog magnesium dieet het ontstaan van vasculaire calcificatie kan tegengaan (preventie; doelstelling 1 uit onderdeel 3.2 van de projectaanvraag), als onderzoeken of een hoog magnesium dieet wanneer er eenmaal vasculaire calcificatie is opgetreden de verdere ontwikkeling hiervan kan vertragen (effect op gevestigde calcificatie; doelstelling 2 uit onderdeel 3.2). Met het starten van het hoog magnesium dieet gelijktijdig met het hoog fosfaat dieet, zorgen we er inderdaad voor dat we het hoog magnesium dieet starten op een moment waarop er nog geen vasculaire calcificaties zijn. Met deze opzet kunnen we doelstelling 1 onderzoeken door aan het eind van het experiment in vaatweefsel te bekijken of er minder dieren vasculaire calcificatie hebben in de groep met een hoog magnesium dieet, en ook kunnen we kijken of de mate van calcificatie in de groepen verschilt. Door gebruik te maken van microCT op verschillende tijdstippen, kunnen we in ditzelfde experiment ook doelstelling 2 onderzoeken. Hiervoor zullen we kijken of vanaf het moment dat we de vasculaire calcificatie voor het eerst zien op de microCT, de progressie van de calcificatie trager verloopt in de groep met het hoog magnesium dieet. Het is namelijk onaanneemelijk dat een directe start met additioneel magnesium calcificatie volledig zal kunnen voorkomen.

Verder hebben we nog toegevoegd dat bij enkele dieren in het experiment gebruik gemaakt zal worden van metabole kooien om naast de serum fosfaatspiegels ook fosfaatexcretie te kunnen meten, zodat we kunnen nagaan of het effect van het hoog fosfaat dieet op de fosfaathuishouding gelijk is in de groep met hoog en laag magnesium dieet. Mocht er verschil zijn tussen beide groepen, dan kunnen we de effecten van fosfaathuishouding en magnesiumdieet bij de data-analyse onderscheiden.

-3.4.2: Wanneer tegen de verwachting in weinig calcificaties ontstaan, dan kan het model aangepast worden door calcitriol toe te voegen. Wat is de rationale achter het toevoegen van calcitriol om calcificaties te induceren? Er zijn immers meerdere opties om calcificatie te stimuleren, maar de keuze voor calcitriol is niet toegelicht c.q. onderbouwd. De DEC adviseert om een go/no go moment op te nemen na de pilots met criteria (o.a. betreffende calcificaties) op basis waarvan besloten zal worden het project te continueren.

Antwoord: Calcitriol, de actieve vorm van vitamine D, heeft onder meer als effect dat de opname van calcium in de darm verhoogd wordt en de renale excretie verminderd wordt, waardoor de plasma calcium spiegel stijgt en ook heeft calcitriol een stimulerend effect op de absorptie van fosfaat in de darm. Calcium is een van de hoofdbestanddelen van vasculaire calcificatie en een verhoogde calciumspiegel bevordert het ontstaan van calcificaties. Toevoeging van calcitriol aan het model van nefrectomie met hoog fosfaatdieet in ratten leidt tot eerder ontstaan van ernstigere calcificaties en is een veelvuldig beschreven model voor vasculaire calcificatie.(3, 4) Actief vitamine D zou dus een goede toevoeging zijn indien onverwacht onvoldoende calcificatie optreedt in het model van alleen nefrectomie en hoog

fosfaat dieet. De reden dat we aanvankelijk geen vitamine D toevoegen, is omdat we alleen noodzakelijke interventies willen doen en geen ernstigere calcificatie willen induceren dan noodzakelijk is voor het bestuderen van de wetenschappelijke vraagstelling, enerzijds om de dieren niet onnodig te belasten en anderzijds omdat bij een te sterke inductie van calcificatie het lastiger zal zijn om een effect van de interventie (magnesium) te kunnen vaststellen. Na de pilot voor het nefrectomie model zal er een go/no go moment zijn, waarbij wat betreft vasculaire calcificatie het criterium voor doorgaan naar het volgende onderdeel van het project zal zijn dat er na succesvolle nefrectomie procedure bij ten minste 60% van de dieren vasculaire calcificatie (gedefinieerd als een positieve Von Kossa-kleuring) optreedt. We hebben het go/no go moment en de volledige criteria daarbij nu toegevoegd in paragraaf 3.4.2 en de criteria ook gespecificeerd in de figuren 1 en 2.

- 3. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatz E, Towler DA, Lacey D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. Nephrol Dial Transplant. 2005;20(7):1370-7.*
- 4. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. Kidney Int. 2008;73(3):300-7.*

-3.4.2: Waarom wordt de eerste pilot bij normale ratten gedaan i.p.v. bij ratten met verminderde nierfunctie?

Antwoord: In de eerste pilot willen we nagaan of we door een verandering van de hoeveelheid magnesium in het dieet een verandering van opname van magnesium in de darm kunnen bewerkstelligen, zich uitend in een verandering van de serum magnesiumspiegel en of dit dieet wordt verdragen.

Het is bekend dat bij eindstadium nierfalen de serum magnesiumspiegels kunnen stijgen ten gevolge van een verminderde renale excretie zelf, waardoor het lastiger is aan te tonen dat een variatie door het dieet alleen komt. Bij minder ernstige stadia van nierinsufficiëntie is dit niet het geval. De mate van nierinsufficiëntie die we bij de dieren zullen induceren middels nefrectomie is minder ernstig dan eindstadium nierfalen. We verwachten daarom geen effect van de nefrectomie op serum magnesiumspiegels. Dit komt overeen met de ervaring vanuit eerdere nefrectomie experimenten in het VUMC, waarbij na succesvolle nefrectomie geen biologische neveneffecten op mineralen van verminderde nierfunctie werden gezien. Als er desondanks toch een gering effect van de verminderde nierfunctie op de plasma magnesiumspiegels zou zijn dan verwachten we niet dat dit verschil dusdanig is dat dit het verdragen van het magnesium dieet zal belemmeren.

-3.4.2: Uit de tijdlijn wordt niet duidelijk waarom de onderzoekers een vergunning tot april 2020 vragen.

Antwoord: Er is een ruime looptijd aangehouden om reserve-tijd in te bouwen voor het geval er vertraging optreedt in de uitvoer van de experimenten. De genoemde looptijd is waarschijnlijk ruimer dan op dit moment noodzakelijk kan worden geacht. We zullen de einddatum van de vergunning daarom aanpassen naar medio 2019. Hierbij houden we er ook rekening mee dat de startdatum van het project na verkregen goedkeuring later te verwachten is dan het aanvankelijk gewenste tijdstip in april dit jaar (nu aangepast naar juni dit jaar). In de tijdlijn hadden we de minimale tijdsduur van de onderdelen afgebeeld, daarbij nog geen rekening houdend met eventuele herhaling van de proef in pilot 1 en pilot 2, en met dat uit pilot 2 een langere follow-up duur voor onderdeel A en B zal kunnen volgen (max 16 i.p.v. 12 weken) en dat in onderdeel A en B niet alle dieren op hetzelfde tijdstip zullen starten omdat het niet mogelijk is alle operaties, scans en cardiomyocyt isolaties op dezelfde dag uit

te voeren. De minimale tijdsduur van de onderdelen is nu weergegeven in geel en de maximale duur per onderdeel in grijs.

Description of Animal Procedures:

-B: Waarom willen de aanvragers alleen mannelijke ratten gebruiken? Een wetenschappelijke onderbouwing voor deze keuze ontbreekt.

Antwoord: Het diersmodel dat we in de studie gebruiken, nefrectomie in combinatie met een hoog fosfaat dieet, is in de literatuur vrijwel altijd beschreven bij mannelijke ratten. Het model is in dit geslacht dus het best gevalideerd. Voor een goede reproduceerbaarheid zullen wij in deze studie ook mannelijke ratten gebruiken.

-H: Hoe lang duren de imaging procedures en welke anesthesie wordt hiervoor toegepast? De dieren met verminderde nierfunctie zijn extra kwetsbaar.

Antwoord: De verwachte duur van de microCT is 20-50 minuten en voor echografie van het hart 20-30 minuten. Een aantrekkelijke vorm van anaesthesie die toegepast kan worden is gasanaesthesie met isofluraan. Pijnstilling is bij deze non-invasieve imaging procedures niet nodig en dus is gasanaesthesie, met weinig tot geen pijnstillende eigenschappen, zonder toevoeging van andere middelen te gebruiken. Voordeel van deze vorm van anaesthesie zijn de eenvoudige toedieningswijze en de farmacokinetische eigenschappen met snelle absorptie bij inademing, snelle verdeling via de bloedstroom, en snelle uitscheiding (vrijwel volledig ongemetaboliseerd) via de longen. Hierdoor is de diepte van anaesthesie goed titreerbaar met snelle inductie en snel herstel en kan deze vorm van anaesthesie herhaaldelijk toegepast worden. Tevens zorgen deze farmacokinetische eigenschappen ervoor dat het middel veilig toegediend kan worden bij een verminderde nierfunctie. In het VUMC wordt dit middel zonder problemen toegepast bij ratten met nefrectomie. Bij echografie van het hart in ratten door de afdeling fysiologie van het VUMC is dit ook de standaardvorm van anaesthesie die toegepast wordt.

-J: De scores voor activiteit, aanblik, en herstel na operatie zijn omschreven. Onduidelijk is waar deze scores toe leiden. Bij welke maximale score worden de dieren uit de proef genomen?

Antwoord: De parameter lichaamsgewicht is een absolute indicatie voor het bereiken van een humaan eindpunt indien er meer dan 20% gewichtsverlies is. De andere genoemde parameters en scores worden gebruikt als hulpmiddel om het welzijn te monitoren, indicatie te stellen voor het oplossen van problemen die een negatief effect op het welzijn hebben, en om een besluit te nemen over implementatie van een humaan eindpunt indien er een persisterende substantiële afname van het welzijn van de dieren is. Hierbij wordt, uitgezonderd bij het lichaamsgewicht, geen absolute score gehanteerd, maar gekeken naar het totaalbeeld in de individuele situatie. In geval van twijfel zal aan de functionaris voor het dierenwelzijn advies worden gevraagd omtrent de te nemen vervolgacties.

-K: De nefrectomie operatie geeft matig ongerief. Resulteert de 5/6 nefrectomie in ernstig ongerief voor alle dieren? Dit lijkt niet in overeenstemming met de beschrijving van het ongerief onder I: "The nephrectomy surgery will result in reduced renal function. If only a small volume of kidney tissue remains after the operation, this can result in full-blown kidney failure with associated effects on serum composition, hemoglobin levels and mineral and bone metabolism, which could have adverse effects on welfare. In previous studies in the UMC, we did not experience side effects of decreased renal function. Apparently, the remaining kidney function is sufficient for animals to survive without compromising their welfare." Welk percentage van de dieren krijgt 'full-blown kidney failure' na nefrectomie? Leidt 'full-blown kidney failure' tot een humaan eindpunt, en welke criteria worden daarvoor

gehanteerd (bijvoorbeeld plotse gewichtstoename)? De commissie verzoekt de aanvragers het ongerief voor de dieren preciezer op te schrijven en in overeenstemming te brengen met de tekst onder I.

Antwoord: De nefrectomie resulteert nadrukkelijk niet voor alle dieren in ernstig ongerief. De beschrijving van het ongerief zoals u kunt vinden onder I is gebaseerd op de ervaring met nefrectomie bij ratten in het VUMC. De nefrectomie wordt daar geclassificeerd als maximaal matig ongerief (ook in projectaanvragen volgens de meest actuele procedure). Aangezien in de handleiding van het projectaanvraagformulier in de toelichting op de classificatie blijvende orgaanschade wordt genoemd onder ernstig ongerief, twijfelden we of we de nefrectomie toch onder maximaal ernstig ongerief moesten classificeren ondanks dat van de verminderde nierfunctie geen nadelige effecten op het welbevinden van de dieren werden waargenomen in eerdere experimenten. We hebben daarom overleg gehad met de animal welfare officer (Bea Zoer) en zij adviseerde om het ongerief beter te hoog in te schatten en dus te classificeren als ernstig. Deze classificatie komt echter niet overeen met het geobserveerde welbevinden bij de experimenten in het VUMC en dit verklaart dus ook de discrepantie met onze beschrijving van ongerief onder I. We hebben de classificatie van het ongerief nu gecorrigeerd naar maximaal matig en horen graag of u hiermee akkoord gaat.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: De NTS is waar nodig aangepast.

-De titel van de NTS dekt de lading beter dan de titel van het projectvoorstel.

Antwoord: Naar aanleiding van uw opmerking hebben we de titel van het projectvoorstel beter in overeenstemming gebracht met de titel van de NTS door deze te wijzigen in: Can additional magnesium reduce the development of cardiovascular complications in chronic kidney disease?

-3.4: De één na laatste zin is niet begrijpelijk voor de doelgroep. De commissie adviseert u het laatste deel (na 'in een pilot getest') weg te laten.

Antwoord: Het laatste deel van deze zin is conform uw advies verwijderd.

- Datum vragen: 10-04-2017
- Datum antwoorden: 18-04-2017

Project Proposal:

-3.1 Vraag 1: De achtergronden van het project zijn nu uitgebreider toegelicht, maar de commissie kan nog steeds niet goed navolgen op grond van welke hypothese de onderzoekers verwachten dat extra magnesium de cardiovasculaire complicaties in CKD kan verminderen. Zonder een heldere hypothese kan de commissie niet beoordelen of de experimenten met het beschreven diermodel kunnen leiden tot het bereiken van de uiteindelijke doelstelling van het project (vermindering van het risico op cardiovasculaire complicaties bij patiënten met CKD). Kunnen de onderzoekers een heldere hypothese toevoegen?

Antwoord: De hypothese van dit project is dat een verhoging van de magnesium intake via het dieet bij chronische nierinsufficiëntie leidt tot minder ontstaan van vasculaire calcificatie gedefinieerd als een lagere calciumcontent in de vaten, en tot minder ontstaan van hypertrofie van het hart gedefinieerd als de ratio van hartgewicht en lichaamsgewicht. We hebben deze hypothese nu expliciet vermeld in paragraaf 3.1 van de project proposal.

Deze primaire hypothese baseren we op de achtergrond zoals aan u werd toegelicht. Primair doel van dit project is niet om het moleculaire mechanisme achter deze relatie vast te stellen. Het primaire doel van dit project is daarom ook niet om een hypothese met betrekking tot een achterliggend moleculair mechanisme te bevestigen.

-3.1 Vraag 2: Het diersmodel is geen model voor nierfalen en vertoont geen verhoogde serum magnesium waarden. De link tussen het diersmodel en de klinische situatie is niet duidelijk aangegeven. Kunnen de onderzoekers dit kort en bondig toelichten? Uit het antwoord op 3.4.2 vraag 4 blijkt eveneens dat het chirurgische model niet goed overeenkomt met de klinische situatie. Een aspect dat de commissie daarbij nog ter overweging wil geven is het feit dat de ingreep (resectie nier) mogelijk een ernstige verstoring zal geven van de calcitriolproductie (worden er analyses van calcitriol overwogen?), een situatie die een sterke deviatie van de patiëntcondities met zich meebrengt.

Antwoord: Mogelijk heeft onze opmerking dat het model met nefrectomie geen model is voor eindstadium nierfalen bij u voor verwarring gezorgd. Het diersmodel is GEEN model voor eindstadium nierfalen, maar het is zeker WEL een model voor nierfalen. Nierfalen wordt gekenmerkt door een vermindering van nierfunctie welke weerspiegeld wordt in een stijging van kreatinine en ureum concentraties in het bloed. Nierfalen kent verschillende stadia, namelijk I tot en met V. Stadium V is eindstadium nierfalen, wat wil zeggen dat nierfunctie vervangende therapie nodig is om de functie van de nier over te nemen en te kunnen overleven. De stadia I tot en met IV zijn stadia met oplopende ernst van nierfalen, waarbij het nog mogelijk is te overleven zonder nierfunctie vervangende behandeling. Verstoringen van elektrolytconcentraties in het bloed treden niet op bij minder ernstige stadia van nierfalen en wel bij ernstigere stadia van nierfalen. Het diersmodel is een model waarbij nierfalen wordt geïnduceerd in een dusdanig stadium dat geen elektrolytverstoringen worden gezien. In combinatie met een hoog fosfaat dieet treden in dit model vaatcalcificaties op. Bij dit diersmodel is er dus net als bij mensen met een dergelijk stadium van nierfalen een verminderde nierfunctie gekenmerkt door een verhoogd kreatinine en ureumgehalte in het bloed en een verhoogd risico op het optreden van vaatcalcificaties.

Klinische observationele studies, hebben zowel in patiënten met eindstadium nierfalen als in patiënten met niet-eindstadium nierfalen, een associatie laten zien tussen de hoogte van het magnesiumgehalte in het bloed en overall-mortaliteit en mortaliteit door hart- en vaatziekten.(1-3) Het diersmodel met nierfalen heeft dus een goede link naar de klinische situatie bij mensen met (niet-eindstadium) nierfalen.

In reactie op uw vraag ten aanzien van calcitriol, kunnen we melden dat uit eerder onderzoek is gebleken dat bij ratten met door nefrectomie geïnduceerd matig nierfalen geen daling van calcitriol optreedt.(4)

1. de Roij van Zuidewijn CL, Grooteman MP, Bots ML, Blankestijn PJ, Stepan S, Buchel J, et al. Serum Magnesium and Sudden Death in European Hemodialysis Patients. PLoS One. 2015;10(11):e0143104.

2. Kanbay M, Yilmaz MI, Apetrii M, Saglam M, Yaman H, Unal HU, et al. Relationship between serum magnesium levels and cardiovascular events in chronic kidney disease patients. Am J Nephrol. 2012;36(3):228-37.

3. Van Laecke S, Nagler EV, Verbeke F, Van Biesen W, Vanholder R. Hypomagnesemia and the risk of death and GFR decline in chronic kidney disease. The American journal of medicine. 2013;126(9):825-31.

4. Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, Inokami T, Hara S, Yamada A, et al. Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. Kidney Int. 2003;64(2):414-20.

-3.4.2 Vraag 1: De commissie is van mening dat sommige apparatuur wel verplaatst zou kunnen worden en dat onderzoekers met specifieke expertise ook op een andere locatie

zouden kunnen werken. Zij vindt dit geen goede argumenten tegen het samenvoegen van de experimentele groepen en het uitvoeren van de experimenten op één locatie. Samenvoeging resulteert namelijk in een substantiële afname van het aantal benodigde dieren. Een ander argument betreft het beschikbare weefsel. Komt men weefsel tekort wanneer de calcificatiestudie en hartstudie in dezelfde dieren worden uitgevoerd?

Antwoord: We begrijpen het belang van het uitvoeren van de experimenten op een dussdanige wijze dat het aantal benodigde dieren zo beperkt als mogelijk is. Naar aanleiding van uw opmerking hebben we daarom nog een keer met veel aandacht de mogelijkheden bekeken.

Voor experiment deel A (vaatcalcificatie) gebruiken we micro-CT. Het apparaat dat hiervoor nodig is, is alleen aanwezig op de locatie in Nijmegen. Dit is een groot apparaat en verplaatsen van dit apparaat naar Amsterdam is uitgesloten.

Voor experiment deel B (hart) gebruiken we echografie van het hart. Bij deze echografie hebben we naast meer gebruikelijke maten als wanddikte en knijpfunctie van de linkerhartkamer, ook specifieke maten van diastolische hartfunctie nodig, te weten deviatie van het atriale septum, PAP-drukken en E/A ratio. Dit omdat er bij nierfalen met name diastolische dysfunctie van het hart optreedt. De deskundigheid voor het vervaardigen van deze geavanceerde echografie van het hart is aanwezig in Amsterdam. Echografie is een realtimeonderzoek, waarbij de betrouwbaarheid van de resultaten sterk afhankelijk is van de kwaliteit van de uitvoerder van de procedure. Mindere kwaliteit van deze uitvoering is na de procedure niet meer op te lossen bij de interpretatie van de beelden. Voorbeeld is dat wanneer een meting verricht wordt in een net iets ander vlak, dit heel andere resultaten kan geven. Indien de echografie dus niet uitgevoerd wordt door de specifiek voor deze metingen ervaren en deskundige mensen (aanwezig in Amsterdam) kan dit grote gevolgen hebben voor de betrouwbaarheid van de resultaten. Aangezien er zo'n 3 nefrectomie procedures per dag kunnen worden gedaan, zullen de tijdstippen voor echografie bij de dieren op verschillende momenten vallen. Tijdens de follow-up periode zal op meerdere tijdstippen een echografie worden verricht. Indien dus het personeel uit Amsterdam dit in Nijmegen zouden moeten doen, zou dit betekenen dat zij voor heel veel korte dagdelen naar Nijmegen zouden moeten komen, met steeds aanzienlijke reistijd waarop zij in Amsterdam hun werkzaamheden niet kunnen verrichten. Dit is qua bedrijfsvoering helaas niet realiseerbaar.

Voor onderdeel B (hart) moeten we ook gebruikmaken van een Langendorff opstelling voor isolatie van vitale hartspiercellen. Deze opstelling bestaat uit een samenstelling van meerdere onderdelen die moet worden opgebouwd. Hiermee kan bereikt worden dat het hart vlot en onder de optimale condities van oxygenatie en temperatuur kan worden behandeld met enzymen, zodat levende cardiomyocyten geïsoleerd kunnen worden. Deze apparatuur is aanwezig in Amsterdam. Verplaatsen van de apparatuur is fysiek moeilijk maar qua bedrijfsvoering onmogelijk. Zoals toegelicht voor de echoprocedure, zullen de dieren het eindpunt op verschillende momenten bereiken en zal dus de cardiomyocyt isolatie apparatuur op afzonderlijke momenten verspreid over een langere periode nodig zijn. Het is niet mogelijk deze apparatuur gedurende deze periode naar Nijmegen te verplaatsen omdat deze ook volop in gebruik is voor andere experimenten in Amsterdam. Bovendien is het essentieel dat de Langendorff opstelling gepositioneerd is direct naast de plaats waar de excisie van het hart plaatsvindt en ook nabij faciliteiten voor microscopie en celkweek, zodat de cellen vitaal kunnen blijven. In Amsterdam is de locatie van de faciliteiten hierop afgestemd, terwijl dit in Nijmegen lastiger te realiseren is. Verder is deskundig, getraind en ervaren personeel nodig om de procedure van cardiomyocyt isolatie uit te voeren. De procedure vereist niet alleen handvaardigheid en kennis, maar ook door ervaring ontstaan vermogen om inschattingen te maken die niet in een protocol gevangen kunnen worden, zoals het voelen aan het hart om

aan de consistentie te bepalen wanneer het juiste tijdstip is bereikt en de enzymen voldoende hebben gewerkt. De procedure wordt in Amsterdam uitgevoerd door een team van op elkaar ingespeeld personeel, waardoor deskundigheid wordt gecombineerd en efficiënt wordt gewerkt waardoor isolatie van vitale cellen mogelijk is. Ook als personeel uit Nijmegen getraind zou worden, zal de procedure vaker mislukken omdat deze procedure voor deze mensen niet een routine wekelijkse taak is (in tegenstelling tot voor het personeel in Amsterdam) en dit zou een toename van het benodigde aantal dieren voor deze procedure veroorzaken. Personeel van Amsterdam in Nijmegen laten werken, is om dezelfde redenen als beschreven voor de echografie qua bedrijfsvoering niet mogelijk. Daarnaast is in Amsterdam de apparatuur aanwezig om in de in vitro experimenten met calciumfluxen en de achtereenvolgende spiercontracties in respons op elektrische stimulatie in individuele vitale cardiomyocyten te meten. Deze apparatuur omvat een microscoop, software en hulpmiddelen voor de elektrische prikkeling (deels custom made). Deze apparatuur is heel lastig verplaatsbaar en kan eveneens niet gemist worden in Amsterdam vanwege andere experimenten.

Ondanks dat we de mogelijkheden nogmaals zorgvuldig hebben bekeken, hebben we om genoemde redenen helaas moeten concluderen dat het onmogelijk is om de experimentele groepen samen te voegen en de experimenten op één locatie uit te voeren.

-3.4.2 Vraag 2: Het gegeven antwoord is geen antwoord op de vraag. De onderzoekers worden verzocht deze vraag opnieuw te beantwoorden.

Antwoord: Naar aanleiding van uw opmerking hebben we geconstateerd dat de formulering van de doelen van het project onvoldoende duidelijk was en we de formulering hiervoor ongelukkig hadden gekozen. Het doel van het project in NIET om te onderzoeken wat het effect is op bestaande vaatcalcificatie als een hoog magnesium dieet wordt gestart als deze vaatcalcificatie al aanwezig is. Enerzijds willen we onderzoeken of er minder vaatcalcificatie ontstaat als er een hoog magnesiumdieet wordt gegeven (doelstelling 1). Anderzijds willen we onderzoeken of een hoog magnesiumdieet een vertraging kan opleveren in moment van ontstaan en daaropvolgende progressie van vaatcalcificatie (doelstelling 2). We hebben de tekst van de doelstellingen aangepast om dit beter te verwoorden.

Description of Animal Procedures:

-B: De commissie is van mening dat de gegeven onderbouwing ('het model is in dit geslacht het best gevalideerd') onvoldoende grond is om het onderzoek alleen met mannelijke dieren uit te voeren. De onderzoekers worden verzocht een betere onderbouwing te geven of dieren van beide geslachten te gebruiken.

Antwoord: We hebben uw advies overgenomen om dieren van beide geslachten in evenwichtige verhouding te gebruiken. We hebben dit in de tekst van de DAP aangepast.

-J: De beschrijving van het humane eindpunt is niet duidelijk genoeg. De commissie heeft nog steeds geen eenduidig beeld van het te hanteren humane eindpunt.

Antwoord: Voor het vaststellen van het humane eindpunt wordt steeds gebruik gemaakt van specifieke scores die eenduidig gehanteerd worden. We hebben dit in de tekst nu duidelijker aangegeven.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

- *Antwoord: De NTS is ongewijzigd.*

- Datum vragen: 15-05-2017
- Datum antwoorden: 22-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.1: De onderzoekers hebben op verzoek van de commissie een hypothese geformuleerd. Daarbij vermelden zij dat deze hypothese is gebaseerd op de beschreven achtergrond, en dat het vaststellen van het moleculaire mechanisme achter deze relatie niet het doel is van dit project.

De toegevoegde hypothese zorgt niet voor meer begrip van de achtergrond waarop deze hypothese is gebaseerd. De commissie blijft van mening dat zij nog steeds niet goed kan navolgen op grond van welke hypothese/visie/ondersteunende waarnemingen de onderzoekers verwachten dat extra magnesium intake via het dieet bij chronische nierinsufficiëntie leidt tot minder ontstaan van vasculaire calcificatie. In de achtergrond wordt weliswaar allerlei informatie over dit onderwerp verstrekt, maar een synthese daarvan die leidt tot de onderbouwde visie van de onderzoekers op een aannemelijk werkingsmechanisme ontbreekt. Naar de mening van de DEC is die visie belangrijk voor het design van het experiment, en daarom noodzakelijk voor de toetsing van dit projectvoorstel. De onderzoekers beweren in hun antwoord dat zij niet geïnteresseerd zijn in een werkingsmechanisme, maar uit de beschrijving van de doelstelling blijkt het tegendeel: "In this research project, we aim to investigate the effects and underlying mechanisms of magnesium etc." Objective 3 en 5 zijn aan het onderzoeken van het mechanisme gewijd. De commissie verzoekt de aanvrager zijn visie op het werkingsmechanisme achter de hypothese toe te voegen.

Antwoord: Naar aanleiding van uw reactie, hebben we geconstateerd dat de formulering van de doelen in de project proposal inderdaad onvoldoende in overeenstemming met de hypothese was en we begrijpen dat deze formulering van de doelen voor onduidelijkheid heeft gezorgd. We hebben nu duidelijker het hoofddoel geformuleerd in de project proposal. Het hoofddoel sluit aan op de hypothese en is: bepalen of verhoging van de magnesium intake via het dieet bij ratten met chronische nierinsufficiëntie leidt tot minder ontstaan van vasculaire calcificatie en minder ontstaan van hypertrofie van het hart. We willen dus vaststellen of er een causaal verband hiertussen is. Uiteraard hebben de werkingsmechanismen wel onze interesse. Dit verklaart dan ook dat objective 3 en 5 zijn gericht op het bekijken van de moleculaire en genetische achtergrond van dit protectieve effect van magnesium. Hierbij zullen we gaan kijken of we verschillen zien in expressie en activiteit van genen en eiwitten die een rol spelen bij vasculaire calcificatie (zoals alkalisch fosfatase, bone morphogenetic protein-2, matrix Gla proteïne, osteonectin) en magnesium transport (zoals TRPM7). Er zijn veel mogelijke theorieën voor het werkingsmechanismen van magnesium op het proces van vasculaire calcificatie. In onze reactie op uw brief van 17-3-2017 beschreven we een aantal mogelijke mechanismen: een direct remmend effect van extracellulaire magnesiumionen op de vorming van hydroxyapatiet kristallen, remmen van calciumkanalen waardoor de overmatige calciuminflux in de gladde spiercellen afneemt, een effect via binding aan de calcium-sensing receptor, of een intracellulair effect van magnesium op het calcificatieproces, waarbij een mogelijk intracellulair effect zou kunnen optreden via remming van de expressie van bot-achtige genen. Er zijn dus veel mogelijkheden en op voorhand kunnen we niet 1 specifieke hypothese geven en ook niet de exacte cascade van achtereenvolgende processen benoemen. We achten het ook niet haalbaar om al deze mogelijkheden in de door ons voorgestelde studieopzet te exploreren. Dit is dan ook niet onze main objective. Wel willen we kijken welke genen en eiwitten mogelijk een rol spelen bij dit effect van magnesium door te kijken naar verschillen tussen de verschillende condities van

het magnesiumdieet. Dit zou kunnen helpen bij het vormgeven van toekomstige studies waarin het werkingsmechanisme verder kan worden uitgewerkt. Als we voor deze secundaire objectives dus een hypothese zouden moeten formuleren, dan zou dit zijn: Een hoger magnesiumdieet verandert expressie en activiteit van genen en eiwitten betrokken bij magnesiumtransport, osteogene differentiatie en vorming van een gecalcificeerde extracellulaire matrix.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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 hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeelden 1 en 4b uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij 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.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten 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 het project is onderzoeken of verhoogde magnesiuminname via de voeding leidt tot minder (cardio)vasculaire aandoeningen bij ratten met verminderde nierfunctie. Het uiteindelijke doel is het verminderen van (cardio)vasculaire aandoeningen bij mensen met chronische nierziekte (CKD). De aanvragers zullen de rol van Mg^{2+} in het ontstaan van calcificaties in bloedvaten en hartdysfunctie onderzoeken in een chirurgisch ratmodel voor CKD. Een hogere Mg-concentratie in het plasma biedt mogelijk bescherming tegen (cardio)vasculaire aandoeningen in dit diermodel. De experimenten zullen een eerste indicatie geven van het mogelijke werkingsmechanisme. In ander vervolgonderzoek (geen onderdeel van deze projectvergunning) zal dit werkingsmechanisme verder kunnen worden onderzocht, waardoor er eventueel aanknopingspunten voor de ontwikkeling van een interventie voor nierpatiënten gevonden worden. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk

gemaakt dat de kennis van het effect van een verhoogde magnesiuminname op (cardio)vasculaire aandoeningen nog zeer beperkt is, en dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen die cardiovasculaire aandoeningen bij nierpatiënten kunnen verminderen of voorkomen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen. De DEC is van mening dat het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Het voorkomen of verminderen van (cardio)vasculaire complicaties bij nierpatiënten (klinisch een groot probleem) kan bijdragen aan een betere kwaliteit van leven voor deze patiënten. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals chronische nierziekte, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.

8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

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

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)

- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☒ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: Voor de meeste dieren wordt een standaard dodingsmethode gebruikt die in bijlage IV van de richtlijn is opgenomen. Voor een klein aantal dieren (7%) wordt een andere methode gevolgd (uitnemen van het hart onder terminale anesthesie) omdat dit noodzakelijk is voor de isolatie van hartcellen. Het ongerief voor de dieren neemt niet toe als gevolg van deze methode, omdat zij onder anesthesie zijn en niet meer bijkomen. De DEC is het eens met deze onderbouwing.

10. In de aanvraag wordt, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden(en): Wanneer uit de pilot studie blijkt dat het post-operatieve herstel na de nefrectomie wordt belemmerd doordat andere dieren de hechtingen beschadigen, dan zullen de experimentele dieren na de operatie overnacht individueel gehuisvest worden. Een beperkt aantal dieren zal maximaal 24 uur in een metabole kooi (dus individueel) worden gehuisvest, om de uitscheiding van electrolyten te kunnen meten. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast doordat hun nierfunctie wordt beperkt, waarvan ze in de praktijk weinig last hebben, en door het instrumentele gebruik dat inherent is aan dierproeven.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met dit model ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De rol van magnesiuminname in het voorkomen of verminderen van cardiovasculaire complicaties bij nierpatiënten kan alleen met proefdieren worden onderzocht, omdat hier complexe interacties tussen organen en regulatoire mechanismen bij betrokken zijn.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Er wordt adequate pijnstilling toegepast rond de operaties, de dieren worden verdoofd voor handelingen waarvoor dit is vereist, en ze krijgen voldoende tijd om te herstellen van de handelingen. Individuele huisvesting wordt tot een minimum beperkt. De DEC is er daarom van overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat niet vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Voor het behalen van de doelstelling is het gebruik van deze dodingsmethode noodzakelijk (zie onderdeel C9 van dit advies).
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Mensen met chronische nierziekte (CKD) hebben een grote kans om te overlijden aan cardiovasculaire complicaties, o.a. door calcificaties en hartfalen. De resultaten van dit project zullen duidelijk maken of calcificaties en hartfalen in de gebruikte diermodellen kunnen verminderen door hogere magnesiuminname, en er zal een eerste indicatie van het werkingsmechanisme worden verkregen. Wanneer daar aanleiding voor is kan in vervolgonderzoek het werkingsmechanisme worden bestudeerd, op basis waarvan uiteindelijk een nieuwe interventie voor nierpatiënten kan worden ontwikkeld. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe therapieën die het verhoogde risico op cardiovasculaire aandoeningen bij nierpatiënten kunnen verminderen van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken of verhoogde magnesiuminname via de voeding leidt tot minder (cardio)vasculaire aandoeningen bij ratten

met verminderde nierfunctie. Het uiteindelijke doel daarvan is het verminderen van (cardio)vasculaire aandoeningen bij mensen met chronische nierziekte (CKD). De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Hoewel er sprake is van een dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

☐ 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 vergunningplichtig 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 geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172225

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 juni 2017. Het gaat om uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020172225. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

19 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 14 juli 2017
Geplande einddatum: 14 augustus 2019
Titel project: The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment
Titel niet-technische samenvatting: Kan extra magnesium de ontwikkeling van problemen aan hart- en vaten bij chronische nierziekte verminderen?
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ [x] Projectvoorstel
☒ [x] Beschrijving Dierproeven
☒ [x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ [x] DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 16 juni 2017

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020172225

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 juni 2017

Vervaldatum: 19 juli 2017

Factuurnummer: 172225

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 CDL

projectnummer: 2016-0096 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]



Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020172225	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101,

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172225

Datum 23 juni 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" met aanvraagnummer AVD1030020172225. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin de Vervanging beter is beschreven?
Kunt u hierin ook 'uit het experiment gehaald worden' (4.4) vervangen door iets anders, bijvoorbeeld 'worden gedood'?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Datum:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1030020172225

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

- ☐ Projectvoorstel
- ☐ Beschrijving Dierproeven
- ☐ Niet-technische samenvatting
- ☐ Melding Machtiging
- ☐ Aanvraagformulier
- ☐
- ☐
- ☐

Datum:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Aan de CCD

t.a.v. [REDACTED],

In reactie op uw brief van 23 juni (referentie Aanvraagnummer AVD1030020172225) sturen we hierbij de aangepaste NTS voor dit project toe.

De geconstateerde onduidelijkheden [uit AanhoudenBeoordelenbrief: Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin de Vervanging beter is beschreven? Kunt u hierin ook 'uit het experiment gehaald worden' (4.4) vervangen door iets anders, bijvoorbeeld 'worden gedood'?] zijn begrepen en de gevraagde aanpassingen zijn gemaakt.

Bedankt voor uw hulp, mede namens de onderzoeker ([REDACTED]).

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101,
6500 HB NIJMEGEN



04 JUL 2017

**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
AVD1030020172225

Bijlagen

1

Datum 3 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" met aanvraagnummer AVD1030020172225. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 28 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS

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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 juli 2017 tot en met 14 augustus 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 juni 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:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 juli 2017 tot en met 14 augustus 2019, voor het project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" met aanvraagnummer AVD1030020172225, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 28 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 juni 2017, ontvangen op 16 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	121	85% Matig 15% Licht	

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.

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

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 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:

AVD1030020172225

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:

AVD1030020172225

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 blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

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