

Inventaris Wob-verzoek W17-17		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20173184	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x	x		x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x	x		x	
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x	x		x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x	x		x	
13	Adviesnota CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x		



04 SEP. 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10500
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	1179037
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713 AV   Groningen
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 8 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 6 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG                      |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED]                   |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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
- 

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Groningen
Datum	30 - 08 - 2017
Handtekening	[Redacted]



## Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

1. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
2. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
3. Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Glomerulosclerose (GS), verlittekening van het filter (glomerulus) in de nier, treedt op in patiënten met ziektes als Diabetische Nefropathie (chronische proteïnurie en GS) en Focal Segmental Glomerulosclerosis (acute proteïnurie en GS). Glomerulosclerose is een progressief ziekteproces, wat leidt tot nierfalen.

Tegenwoordig zijn therapeutische behandelingen van GS gericht op remming van ontsteking en verlaging van bloeddruk. Deze behandelingen zijn echter gelimiteerd effectief waardoor de GS veelal leidt tot End-Stage-Renal Disease, waarvan de enige behandelmogelijkheden dialyse en niertransplantatie zijn. Daarnaast is nierfalen geassocieerd met een verhoogd risico op hart-en vaatziekten. Hierdoor hebben GS patiënten een hoger risico op overlijden (Schiffrin et al., *Circulation*, 2007). Het is van cruciaal belang om meer inzicht te krijgen in de moleculaire en cellulaire pathofysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling en progressie van GS, teneinde nieuwe therapeutische strategieën te kunnen ontwikkelen voor de behandeling van GS.

Proteïnurie, het verlies van eiwit in de urine, is het belangrijkste kenmerk van GS en wordt veroorzaakt door schade aan de glomerulaire filtratie barrière. Deze filtratie barrière bestaat uit 3 lagen: 1) endotheelcellen bedekt met een (door endotheelcellen geproduceerde) slijm laag (de glycocalyx), 2) de glomerulaire basaal membraan en 3) podocyten. Wanneer een van deze 3 componenten beschadigd raakt, neemt de doorlaatbaarheid van de filtratie barrière toe, waardoor essentiële stoffen en eiwitten uit het bloed in de urine terecht komen en verloren gaan (Patrakka and Tyggvason, *Biochem Biophys Res Commun*, 2010).

Verscheidene studies laten zien dat beschadiging van endotheel een cruciale rol speelt in de ontwikkeling van GS en dat gezonde endotheelcellen van essentieel belang zijn om de ontwikkeling van GS en nierfalen te voorkomen (Sun et al., *PLoS One*, 2013; Gil et al., *Diabetes*, 2016; Nakagawa et al., *J Am Soc Nephrol*, 2007; Garsen et al., *J Am Soc Nephrol*, 2016). In de glomerulus staan de verschillende celtypen in nauw contact met elkaar via autocriene en paracriene mechanismen, wat zorgt voor een zeer gebalanceerde communicatie (Schlondorff D et al., *J Am Soc Nephrol*, 2009). Door beschadiging van het endotheel zijn de signalen van de endotheelcel naar de andere celtypen veranderd, waardoor GS ontstaat (Gnudi, *Nephrol Dial Transplant*, 2012).

Uit recent eigen onderzoek is gebleken dat het epigenetische enzym Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) verhoogd tot expressie komt in glomerulaire endotheelcellen in nierweefsel van muizen met GS. EZH2 plaatst methylgroepen op lysine 27 van histon 3, waardoor de conformatie van het DNA meer gesloten wordt en genexpressie wordt voorkomen. EZH2 komt voor in ieder celtype en is in endotheelcellen van groot belang voor het behoud van endotheelfuncties (Maleszewska et al., *Angiogenesis*, 2016). Een verhoging van EZH2 in de endotheelcellen zorgt voor een veranderd expressiepatroon van genen geassocieerd met endotheelceldisfunctie, een staat waarin de essentiële functies van het endotheel verminderd aanwezig zijn. Ons onderzoek laat zien dat EZH2 vele genen reguleert die geassocieerd zijn met GS, [REDACTED], [REDACTED] en inflammatie (Maleszewska et al., *Angiogenesis*, 2016; Dreger et al., *Hypertension*, 2012, eigen preliminaire data). Een verhoogd EZH2 niveau kan daarom een belangrijke schakel zijn in het ontwikkelen van functieverlies van de glomerulus.

Op basis van bovenstaande is onze hypothese dat verlaging van EZH2 in glomerulair endotheel zorgt voor een verminderde ontwikkeling van GS. Om deze hypothese te toetsen stellen we voor middels experimentele therapie de EZH2 expressie [REDACTED] te verlagen en de invloed hiervan op GS ontwikkeling te onderzoeken.

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]. Tevens wordt in dit project een proof-of-concept geleverd voor het effectief kunnen bereiken en targeten van glomerulair endotheel tijdens glomerulosclerose.

In huidig projectaanvraag zal gebruik gemaakt worden van twee verschillende muismodellen, namelijk een muismodel voor chronische GS (BTBR<sup>ob/ob</sup>) en een muismodel voor acute proteïnurie en GS (anti-Thy1.1).

[REDACTED]

De hypothese die in huidig project gehanteerd wordt is dat verhoogde EZH2 expressie in de glomerulaire endotheelcellen de ontwikkeling en progressie van zowel chronische GS als acute GS veroorzaakt hetgeen leidt tot proteïnurie. Hierbij wordt dan ook onderzocht wat de invloed is van [REDACTED] [REDACTED] verlagings van EZH2.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Hoofddoelstelling: Het bestuderen van de rol van glomerulair [REDACTED] EZH2 in de ontwikkeling en progressie van glomerulosclerose (GS).

Het doel van dit project is het bestuderen van het effect van [REDACTED] verlagings van EZH2 in zowel chronische GS als acute GS. [REDACTED]

[REDACTED] Op deze manier kan de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 worden onderzocht in de ontwikkeling en progressie van chronische GS en acute GS.

Voor de uitvoering van de hierboven beschreven onderdelen is alle benodigde expertise en infrastructuur aanwezig binnen de afdeling Pathologie en Medische Biologie in het Universitair Medisch Centrum

Groningen. De dierexperimenten worden uitgevoerd in het dieren laboratorium van de Rijksuniversiteit Groningen (Centrale Dienst Proefdieren). Bij de uitvoer van de dierexperimenten is alleen bevoegd en gecertificeerd personeel betrokken. De gekozen proefopstelling is zodoende uitvoerbaar binnen de voorgenomen kaders.

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Glomerulosclerose (GS), verlittekening van het nierfilter (glomerulus), treedt op in patiënten met ziektes als Diabetische Nefropathie (chronische GS) en Focal Segmental Glomerulosclerosis (acute proteïnurie gevolgd door GS). GS is een progressief ziekteproces, wat leidt tot nierfalen. Tegenwoordig zijn therapeutische behandelingen van GS gericht op remming van ontsteking en verlaging van bloeddruk (Fu et al., Am J Physiol Renal Physiol, 2015). Deze behandelingen zijn echter gelimiteerd effectief waardoor de GS veelal leidt tot End-Stage-Renal-Disease, waardoor veel patiënten dialyse en niertransplantatie moeten ondergaan (Gnudi, Nephrol Dial Transplant, 2012; Zschiedrich et al., J Am Soc Nephrol, 2017). Tevens is nierfalen geassocieerd met de ontwikkeling hart-en vaatziekten, waaraan veel patiënten overlijden (Sarnak et al., Circulation, 2003).

Ondanks het feit dat er reeds veel onderzoek is verricht naar de mogelijke onderliggende mechanismen van het ontstaan van GS, is er nog geen therapie die GS kan voorkomen of remmen. Het is daarom van cruciaal belang om meer inzicht te krijgen in de moleculaire en cellulaire pathofysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling en progressie van GS, en om therapeutische strategieën te ontwikkelen voor de behandeling van GS. Wanneer het verlagen van EZH2 [REDACTED] resulteert in minder GS, geeft dit de mogelijkheid om GS beter te behandelen.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Uit onderzoek uitgevoerd binnen het laboratorium van de [REDACTED] is gebleken dat EZH2 is verhoogd in de glomerulaire endotheelcellen van muizen met gevorderde chronische glomerulosclerose (GS) (in het BTBR<sup>ob/ob</sup> model voor diabetische nefropathie; archiefmateriaal van de [REDACTED]). *In vitro* is in glomerulaire endotheelcellen gevonden dat verhoogd EZH2 bijdraagt aan endotheel disfunctie. Daarom zal in dit onderzoek EZH2 [REDACTED] tijdens chronische GS, om te onderzoeken wat de rol is van EZH2 [REDACTED] tijdens de ontwikkeling van GS. Alvorens het dierexperiment uit te voeren, zal eerst worden bestudeerd op welke leeftijd een verhoging van EZH2 opkomt in muizen met chronische GS. Dit zal worden onderzocht in archiefmateriaal tussen de leeftijden van 8 en 24 weken in BTBR<sup>ob/ob</sup> ten opzichte van BTBR<sup>wt/wt</sup> (controle muis). [REDACTED] wordt vastgesteld. Op deze manier kan de rol van EZH2 in de ontwikkeling en progressie van GS worden onderzocht.

De experimenten in de deelprojecten zijn opgedeeld in 3 subonderdelen:

1. [REDACTED]
2. Het verlagen van EZH2 in glomerulair endotheel in GS [REDACTED] Wanneer EZH2 succesvol wordt verlaagd, wordt doorgedaan met subonderdeel 3.
3. Interventie studie: Het langdurig targeten van EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel om op deze manier de rol van glomerulair endotheliale EZH2 te onderzoeken in de ontwikkeling en progressie van chronische GS.

Wanneer EZH2 kan worden getarget in glomerulaire endotheelcellen in het BTBR<sup>ob/ob</sup> model (chronische



GS), zal deze targeting ook worden uitgevoerd in het Thy1.1 model (acute GS).

In het muismodel voor chronische GS ontwikkelt GS spontaan als gevolg van de genetische achtergrond van de muizen. In het muismodel voor acute GS wordt GS geïnduceerd door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antilichamen. Hierdoor ontstaat een ontstekingsreactie in de glomerulus en acute proteïnurie met GS tot gevolg. De muismodellen voor chronische GS en acute GS behoeven daardoor een andere experimentele opzet. De experimenten in de twee muismodellen is daarom opgedeeld in twee deelprojecten.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Dit project is opgedeeld in twee deelprojecten:

**Deelproject 1.** Hierin wordt de rol van EZH2 in het glomerulair endotheel onderzocht in een muismodel voor chronische GS (BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel). Dit deelproject is onderverdeeld in drie subonderdelen:

1. [redacted] een verlaging van EZH2 in het glomerulair endotheel bewerkstelligen tijdens GS. Tevens zal ook in andere organen worden bestudeerd of EZH2 in de endotheelcellen wordt verlaagd en wat de effecten hiervan zijn. Wanneer de aflevering (subonderdeel 1) en verlaging van EZH2 (subonderdeel 2) in de glomerulaire endotheelcellen succesvol is, wordt doorgedaan met subonderdeel 3.
3. Interventiestudie: Het langdurig targeten van EZH2 [redacted] om de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 te onderzoeken in de ontwikkeling en progressie van GS. Tevens wordt een experimentele groep behandeld met een farmacologische inhibitor van EZH2 als positieve controle.

In **deelproject 2** zullen de 3 bovengenoemde subonderdelen in een muismodel voor acute GS (anti-Thy1.1 muismodel) worden uitgevoerd en bestudeerd. Dit wordt gedaan om de algemene toepasbaarheid van de bevindingen uit de studies in chronische GS te toetsen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Dit project is opgedeeld in 2 deelprojecten, welke beide zijn opgedeeld in 3 subonderdelen:

Er wordt gestart met **deelproject 1**, welke het doel heeft de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 tijdens chronische glomerulosclerose (GS) te onderzoeken. Deelproject 1 is onder te verdelen in de volgende subonderdelen met bijbehorende go/no go beslissingen:

1. [redacted]. Hierbij wordt tevens de biodistributie en eventuele nier- en levertoxiciteit [redacted] onderzocht. Wanneer dit succesvol is, wordt doorgedaan met subonderdeel 2. Wanneer niet succesvol of een te hoge nier- en/of levertoxiciteit ontstaat, zal het experiment niet verder worden uitgevoerd (NO GO). [redacted]
2. Onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in het glomerulair endotheel bewerkstelligen tijdens GS. Tevens zal ook in andere organen worden bestudeerd of EZH2 in de endotheelcellen wordt verlaagd en wat de effecten hiervan zijn. Wanneer verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen succesvol is, wordt

doorgegaan met subonderdeel 3. Wanneer dit niet succesvol is, zal niet worden doorgedaan met het experiment (NO GO).

Alvorens subonderdeel 3 wordt uitgevoerd, zal een pilot experiment worden uitgevoerd. Wanneer niet de beoogde effectgrootte wordt behaald in de pilot, zal niet worden doorgedaan met subonderdeel 3.

3. Interventiestudie: Het langdurig targeten van EZH2 om de rol van glomerulair endotheliale EZH2 te onderzoeken in de ontwikkeling en progressie van GS.

In **deelproject 2** zullen de 3 bovengenoemde subonderdelen in een muismodel voor acute GS (anti-Thy1.1 muismodel) worden uitgevoerd en bestudeerd. Dit wordt gedaan om de algemene toepasbaarheid van de bevindingen uit de studies in chronische GS te toetsen. In deelproject 2 zijn aan het eind van subonderdelen 1 en 2 dezelfde go/no go punten aanwezig als in deelproject 1.

Het is nog niet bekend of een verhoging van EZH2 ook aanwezig is in glomerulaire endotheelcellen in het muismodel voor GS na acute proteïnurie (anti-Thy1.1). Dit zal eerst worden onderzocht in archiefmateriaal, alvorens deelproject 2 wordt uitgevoerd. Wanneer EZH2 verhoogd blijkt te zijn in de glomerulaire endotheelcellen in het anti-Thy1.1 muismodel zal deelproject 2 worden uitgevoerd.

**In beide deelprojecten kunnen de resultaten van subonderdeel 1 subonderdeel 2 blokkeren, en de resultaten van subonderdeel 2 en het pilotexperiment kunnen subonderdeel 3 blokkeren.**

**Hierdoor wordt verwacht dat de subonderdelen 1 en 2 van deelprojecten 1 en 2 de totale deelprojecten 1 en 2 niet zullen blokkeren.**

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS
2	Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen.
- 1.2 Looptijd van het project | 01-11-2017 – 01-11-2022
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Glomerulosclerose, verlittekening, endotheel, EZH2

## 2 Categorie van het project

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

## 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Een belangrijke taak van de nieren is het verwijderen van afvalstoffen uit het bloed. De eerste stap van dit zuiveringsproces is filtratie; bloedvloeistof wordt door het filter in zeeflichamen (glomeruli) geperst en opgevangen. Bloedcellen en grote eiwitten blijven achter in het bloed.
- Veel nierziekten hebben te maken met de toestand van de zeef in deze glomeruli. Glomerulosclerose, verlittekening van de zeeflichamen in de nier, leidt tot nierfalen.
- Slecht functionerende cellen in de zeeflichamen – het gaat om de zgn. glomerulaire endotheelcellen - spelen een cruciale rol in de ontwikkeling en voortgang van glomerulosclerose. Het eiwit EZH2 is in verhoogde mate aanwezig in glomerulaire endotheelcellen tijdens glomerulosclerose en lijkt

een sleutelrol te spelen in het disfunctioneren van de endotheelcellen.

Dit project heeft twee doelstellingen:

1. De bijdrage van het glomerulair endotheel aan de ontwikkeling en progressie van glomerulosclerose en de rol van EZH2 hierin onderzoeken.
2. Het onderzoeken van de (mogelijk therapeutische) gevolgen van uitschakeling van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen.

Voor het behalen van deze doelstellingen hanteren we drie deelvragen:

1. Kunnen stoffen die de aanmaak van EZH2 beïnvloeden worden afgeleverd in het glomerulair endotheel tijdens glomerulosclerose?
2. Kan de aanmaak van EZH2 in het glomerulair endotheel worden stopgezet of verlaagd?
3. Wat is het effect van verlaagd EZH2 in glomerulair endotheel op de ontwikkeling en voortgang van glomerulosclerose?

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

**Medische opbrengsten:**

Glomerulosclerose leidt tot chronische nierschade en is aanwezig bij bijna alle nierziekten, ongeacht hun oorzaak. In Nederland hebben 1,7 miljoen mensen chronische nierschade. Het is niet duidelijk wat de moleculaire processen zijn die glomerulosclerose en daardoor chronische nierschade veroorzaken. Onderzoek naar de mechanismen van glomerulosclerose is derhalve van groot belang.

Dit project levert de volgende vernieuwende bijdragen:

1. Inzicht over de rol van glomerulaire endotheelcellen en EZH2 in het ontstaan van glomerulosclerose.
2. Ontwikkeling van nieuwe therapeutische benaderingen voor glomerulosclerose.

**Wetenschappelijk en maatschappelijk belang:**

Meer inzicht krijgen in de ontwikkeling van glomerulosclerose en de specifieke bijdrage van glomerulair endotheel hierin om op termijn een nieuwe behandelingsmethode mogelijk te maken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

588 muizen

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

De muizen ontwikkelen glomerulosclerose door diabetes of acute proteïnurie. Dit veroorzaakt licht ongerief. De muizen krijgen injecties met een experimenteel middel, wat, afhankelijk van het aantal injecties, licht tot matig ongerief veroorzaakt.

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

Licht tot matig ongerief.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De muizen worden geëuthanaseerd in kader van het experiment. Hun organen en bloed worden verder bestudeerd in het laboratorium.



## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Er bestaat geen alternatief model voor de ontwikkeling van glomerulosclerose.

### 4.2 **Vermindering**

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

Er wordt verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt door:

1. Statistische berekeningen vooraf
2. Pilot experiment
3. Stapsgewijze uitvoering van experimenten (tevorens vastgestelde go/no go beslismomenten)

### 4.3 **Verfijning**

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

1. Een speciale muizenstam (BTBR obese muizen) ontwikkelt spontaan glomerulosclerose zoals bij de mens, in tegenstelling tot chemische modellen. Dit model bootst humane chronische glomerulosclerose het beste na.
2. Muizen van een andere muizenstam (anti-Thy 1.1) ontwikkelen door een injectie versneld proteïnurie en glomerulosclerose. Deze stam is geschikt om glomerulosclerose in een korte tijdspan te onderzoeken. Dit model is het meest specifiek in de ontwikkeling van acute proteïnurie en glomerulosclerose.

Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.

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

In dit project worden de volgende humane eindpunten gehanteerd en gewaarborgd:

- Gewichtsverlies van meer dan 20%. De dieren worden om de dag gewogen.
- Extra ongerief door condities niet gerelateerd aan het experiment, zoals wondjes en infecties. Het welzijn wordt om de dag gecontroleerd.
- Te hoog niveau bloedglucose door diabetes. Dit wordt wekelijks gemeten.
- Te hoge totaal score voor kenmerken van algeheel ongerief, zoals activiteit, wassen, rillen en vachtstructuur. Het gedrag en welzijn wordt om de dag geobserveerd en bijgehouden.

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In dit project worden twee verschillende groepen muizen gebruikt: (a) BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen en (b) BTBR<sup>wt/wt</sup> (erkende leverancier):

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (8-20 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen betreffen een model in de BTBR (black and tan, brachyuric) muis. Deze muizen hebben een ob/ob leptine-deficiëntie mutatie en ontwikkelen hierdoor diabetes mellitus type 2 (DMT2), waaronder hyperglycemie en insuline resistentie. Vanaf week 4 ontstaat proteïnurie en vanaf week 8 glomerulosclerose (GS), verlittekening van de filters in de nier (de glomeruli). Na 20 weken zijn glomerulaire laesies aanwezig, die vergelijkbaar zijn met humane GS in diabetische nefropathie. Er is gekozen voor dit model omdat de BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen spontaan glomerulosclerose (GS) ontwikkelen, hetgeen de GS in de humane situatie het best reflecteert. BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen ontwikkelen diabetische nefropathie met chronische GS in een relatief korte tijdsduur, waardoor dit model zeer geschikt is om de hieronder beschreven interventiestudie te toetsen in een (relatief) korte tijdspan. In de literatuur is het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel een gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om diabetische nefropathie en daarmee chronische GS te bestuderen. BTBR<sup>wt/wt</sup> wordt gebruikt als (niet-diabetische) controle voor BTBR<sup>ob/ob</sup>.

[redacted]

### Subonderdeel 1

Dit onderdeel heeft als doel de [redacted] biodistributie en de eventuele nier- en levertoxiciteit in diabetische nefropathie te bestuderen.

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt:

De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted], zoals hieronder beschreven:

BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:

- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]

Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De groepen muizen worden 6 uur na de [redacted] geëthanaseerd onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In het geïsoleerde bloed en weefsels wordt de [redacted], de bio-distributie en eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel zijn afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:



Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



### Subonderdeel 2

Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 [redacted] worden bestudeerd:

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt:

De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted]. De BTBR<sup>ob/ob</sup> controlegroepen ontvangen [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted], zoals hieronder beschreven:

BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden hierbij opgedeeld in 4 verschillende groepen:

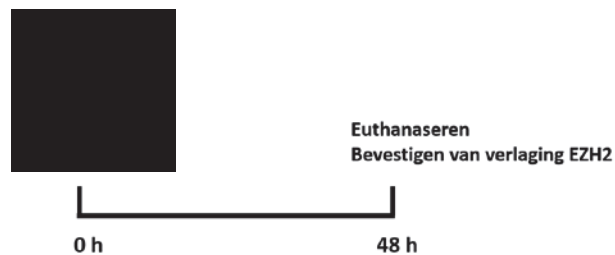
- Behandeling met [redacted] [redacted] [redacted]
- Behandeling met [redacted] [redacted] [redacted]
- Behandeling met [redacted] [redacted] [redacted]

- Behandeling met [REDACTED])  
Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De muizen worden 48 uur na de [REDACTED] injectie geëthanaseerd onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd of een verlaging van EZH2 in endotheelcellen plaatsvindt na behandeling met de verschillende soorten SOS.

Dit tijdstip wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [REDACTED] een verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen ten opzichte van de controlegroepen die [REDACTED] hebben ontvangen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



### Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [REDACTED] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen te behandelen met als doel EZH2 chronisch (gedurende 4 weken) te verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen.

Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met niet-getargere EZH2 remmer uitgevoerd om EZH2 te verlagen. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Voor dit doeleinde worden zowel BTBR<sup>ob/ob</sup> als BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen gebruikt. In de experimenten worden alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen aan elkaar gematched aan de hand van de mate van proteinurie, leeftijd (8-20 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

Gedurende 4 weken, worden BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [REDACTED]. BTBR<sup>wt/wt</sup> zullen gedurende deze 4 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit [REDACTED]. De eerste injectie zal plaatsvinden wanneer de muizen tussen 8 weken en 20 weken oud zijn.

Naast de [REDACTED] groepen, wordt een groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gedurende 4 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrekkelijke dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen wordt gedurende 4 weken behandeld met vehicle.


Hieronder zijn de groepen beschreven:

De BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden onderverdeeld in 7 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED])
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2



**PROCEDURE**

	<b>Physical examination</b>	<b>Body weight</b>	<b>Injection vehicle/</b> 	<b>Blood collection</b>	<b>Urine collection (metabolic cage 24h)</b>	<b>Harvest kidney + other organs</b>	<b>Weigh organs and fixation/freezing</b>
<b>TIME (days)</b>	-7	X	X		X		
	-6	X	X				
	-5						
	-4	X	X				
	-3						
	-2	X	X				
	-1						
	0	X	X	X	X		
	1						
	2	X	X				
	3						
	4	X	X				
	5						
	6	X	X			X	
	7	X	X	X	X		
	8	X	X				
	9						
	10	X	X				
	11						
	12	X	X				
	13					X	
	14	X	X	X	X		
	15	X	X				
	16						
	17	X	X				
	18						
	19	X	X				
	20						
	21	X	X	X	X		
22	X	X					
23							
24	X	X					
25							
26	X	X					
27					X		

	28	X	X		X		X	X
--	----	---	---	--	---	--	---	---

Om de rol van EZH2 in het glomerulair endotheel tijdens GS te onderzoeken, wordt 4 weken als tijds punt aangehouden, aangezien over een langere periode (4 weken) zal worden onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geïnhibeerd en/of gestopt. Op een vroeger tijds punt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 4 weken worden alle muizen geëuthanaseerd, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren zal worden onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. [redacted]. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [redacted] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2 en eventueel een effect hebben gehad op de gevolgen van diabetes mellitus type 2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

1. Albumine-creatinine ratio (primaire uitleesparameter van nierfunctie)
2. Plasma glucose en insuline (als maat voor DMT2 in de muizen)
3. Urine glucose
4. Urine elektrolyten (als maat voor nierschade)
5. Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
6. Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
7. Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

1. Spontane inductie van GS door genetische achtergrond in BTBR<sup>ob/ob</sup>. Dit is in de literatuur een van de meest gangbare en gestandaardiseerde modellen voor diabetische nefropathie en daardoor chronische GS.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle of [redacted] gedurende 4 weken. [redacted]. Tevens zal na subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en -schade en de status van diabetes mellitus type 2 worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Gedurende 35 dagen zullen de muizen vier keer worden gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Voorafgaand aan huisvesting in metabole kooien wordt door middel van gedragsobservaties en lichaamsgewichtsbepaling vastgesteld dat de dieren in staat zijn een metabole kooi experiment te ondergaan.

5. Euthanaseren 28 dagen na eerste intraveneuze injectie, onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 28 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Subonderdeel 1:

In dit experiment wordt de aflevering van de [redacted] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [redacted] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd om het aantal benodigde dieren te berekenen.

Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, [redacted] e stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen getargete en niet-getargete SOS. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:



- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 7%
- Effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> ( [redacted] ) zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

**2 groepen x (n=10) = 20 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen**

#### Subonderdeel 2:

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse. In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen vakgroep, waarbij ook [redacted] bevatten werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd. We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van [redacted]. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom n=6 muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt ( [redacted] )

**4 groepen x (n=6) = 24 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen.**

#### Subonderdeel 3:

Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.

Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen wordt de mate van albumine-creatinine ratio (ACR) aangehouden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR<sup>ob/ob</sup> een albumine-creatinine ratio hebben van gemiddeld 850  $\mu\text{g}/\text{mg}$  en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: BTBR<sup>ob/ob</sup> vehicle en BTBR<sup>ob/ob</sup> [redacted]. Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0,95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in ACR: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgegaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse. Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de Albumine-Creatinine ratio die wordt gemeten in de urine.

We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.05$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Effect grootte in ACR = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.

In totaal worden 1 groep BTBR<sup>wt/wt</sup> en 7 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> gebruikt = 8 groepen.

**8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen en 175 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen).**

In totaal worden in dit deelproject maximaal gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 BTBR<sup>ob/ob</sup>
- Subonderdeel 2: 24 BTBR<sup>ob/ob</sup>
- Pilot: 50 BTBR<sup>ob/ob</sup>
- Subonderdeel 3: 175 BTBR<sup>ob/ob</sup> en 25 BTBR<sup>wt/wt</sup>

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

In deze studie worden type BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt, welke door een leptine-deficiëntie mutatie diabetes mellitus type 2 (DMT2) ontwikkelen en daardoor diabetische nefropathie met chronische GS. Deze stam ontwikkelt spontaan GS, waardoor GS niet geïnduceerd hoeft te worden middels aanvullende interventie. De achtergrond van deze muis is BTBR (black and tan, brachyuric). BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen zijn dezelfde muisstam als BTBR<sup>ob/ob</sup>, maar hebben geen leptine-deficiëntie mutatie in het genoom en daarom vanzelfsprekend geen DMT2, proteïnurie en GS, waardoor deze muis als (niet-diabetische) controle wordt gehanteerd.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, doordat de proteïnurie in de vrouwelijk BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen niet stijgt, maar fluctueert tussen week 8 en week 16 (Hudkins et al, J American Soc Nephrol, 2010). Mannelijke muizen laten tot en met week 20 een stijging in proteïnurie zien. Doordat als primaire uitleesparameter proteïnurie (ACR) wordt gehanteerd, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Daarom dat zullen in zowel subonderdeel 1, 2 als 3 mannelijke muizen worden gebruikt.

De leeftijd van de muizen voor het toedienen van de [REDACTED] is afhankelijk van de expressie van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen. Het is reeds bekend dat op een leeftijd van 24 weken, EZH2 significant is verhoogd in de glomerulaire endotheelcellen in BTBR<sup>ob/ob</sup> ten opzicht van BTBR<sup>wt/wt</sup>. De [REDACTED] zullen worden toegediend op het moment dat een verhoging van EZH2 voor het eerst optreedt in BTBR<sup>ob/ob</sup> ten opzichte van controle dieren BTBR<sup>wt/wt</sup> of op de vroegst mogelijke leeftijd dat experimenten met de dieren mogelijk

is. Dit moet echter nog worden uitgezocht in weefsels van BTBR<sup>ob/ob</sup> dieren van verschillende leeftijden. Dit zal worden gedaan in archiefmateriaal in samenwerking met een onderzoeksgroep van de Universiteit van Heidelberg. Daarom zullen de [REDACTED] worden toegediend tussen de leeftijden 8 en 24 weken.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

Voordat wordt begonnen aan deze dierstudie is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor [REDACTED]. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress.

Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebrafish of fruitvlieg. Verder is het gebruik van 'lagere' diersoorten niet mogelijk, aangezien de effecten van [REDACTED] met siRNA primair in het glomerulair endotheel worden onderzocht, waarbij de primaire uitleesparameter ACR is.

#### Verfijning

Het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel is het muismodel voor diabetische nefropathie dat spontaan glomerulosclerose ontwikkelt. Hierdoor hoeven de dieren niet worden geïnjecteerd met chemische middelen en ervaren hierdoor minder ongerief. Tevens ontwikkelen de muizen diabetische nefropathie in een relatief korte tijdsduur. Hierdoor kan de [REDACTED] interventie worden getest in een korte tijdspan, wat ook minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur.

Er wordt gekozen voor een dosis waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwacht dat geen toxiciteit en ongerief wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden om de dag gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden geëuthanaseerd. Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.

Na bloedafname en injectie met [REDACTED] onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking. De muizen worden om de dag gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierversorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt

over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

### **Vermindering**

Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke geëuthanaseerd worden op het tijdstip van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (4 weken ofwel 28 dagen).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Nadat GS spontaan is ontwikkeld, kan de muis een ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: Vermeerderde eetlust/drinken, gewichtstoename. Om aan de vergrote eetlust te voldoen, zullen de dieren eten en drinken ad libitum krijgen.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [REDACTED] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De gebruikte [REDACTED] is afgeleid van subonderdelen 1 en 2 en studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde en gepubliceerde studies.

De muizen worden om de dag gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en diervverzorgers van de proefdierfaciliteit. Indien nodig worden dieren eerder opgeofferd dan gepland op basis van bereikte humane eindpunten.

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

---

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De niveaus van glucose worden wekelijks gemeten, om de status van de diabetes nauwkeurig in de gaten te houden.

De eetlust van de BTBR<sup>ob/ob</sup> dieren is verhoogd waardoor deze dieren meer gaan eten, gewichtstoename ondervinden en obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van. Voedsel zal ad libitum worden aangeboden, om te zorgen dat de muizen voldoende te eten hebben. De muizen zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [REDACTED] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [REDACTED] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze vakgroep, verwachten we geen nier- en levertoxiciteit van de dosis [REDACTED]

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden.

De eetlust van de BTBR<sup>ob/ob</sup> dieren is verhoogd waardoor obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [REDACTED] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Ter verlichting van het lichte ongerief door de vermeerderde eetlust, zal voer ad libitum worden aangeboden in de kooi.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [REDACTED] of vehicle onder

algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

De dieren zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en geëuthanaseerd.

## J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, [REDACTED] onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen wanneer een van de volgende omstandigheden zich aandienen:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

De muizen worden maximaal 35 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen verwacht.

In subonderdeel 2:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen verwacht.

In subonderdeel 3:

Er wordt in de groep BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

## K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De mate van ongerief door de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie, glomerulosclerose is licht.

De mate van ongerief door de eenmalige [REDACTED] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [REDACTED] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is geschat als matig.



Vier maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie en GS het gevolg is van de genetische achtergrond van de muizen. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [REDACTED] en het wondje in de staart door bloedafname.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De groepen muizen zullen actief worden geëuthanaseerd 28 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. Hierin zullen belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- |   |                             |  |
|---|-----------------------------|--|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.                                    | 10500                       |  |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.                          | Rijksuniversiteit Groningen |  |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.                              | Volgnummer                  | Type dierproef   |
| <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 2                           | Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In dit project worden Thy1.1 muizen gebruikt (erkende leverancier), opgedeeld in 2 groepen: (a) met anti-Thy1.1 antilichamen behandeld voor inductie acute proteïnurie gevolgd door GS (anti-Thy1.1 muizen) (b) met niet-reactief IgG antilichamen behandeld (IgG muizen), als controle groep:

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

De anti-Thy1.1 muis staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarin zich acute proteïnurie ontwikkelt gevolgd door glomerulosclerose (GS). In de glomerulus, op de podocyten, van deze muis komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 60-80% van de glomeruli sclerose bevatten. Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan ontwikkelt en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Doordat een ontstekingsreactie gaande is in de glomeruli van Thy1.1 muizen die anti-Thy1.1 antilichamen

geïnjecteerd hebben gekregen, is het glomerulair endotheel geactiveerd/beschadigd en daardoor wordt het adhesie molecuul E-selectine tot expressie gebracht op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcel.

### Subonderdeel 1

Dit onderdeel heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] biodistributie en de eventuele nier-en levertoxiciteit in acute proteïnurie en GS te bestuderen:

In bijlage 1 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose onderzocht in het chronische BTBR<sup>ob/ob</sup> model. Deze muizen ontwikkelen glomerulosclerose door een genetische verandering. In de huidige bijlage wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose in het acute anti-Thy1.1 model onderzocht. Deze muizen worden geïnjecteerd met anti-Thy1.1 antistoffen waardoor glomerulosclerose ontstaat.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose in deze modellen door andere stimuli veroorzaakt wordt, kan de activatie van glomerulaire endotheelcellen verschillend kan zijn in beide modellen. [redacted]

[redacted] expressie wordt geanalyseerd in archiefmateriaal van anti-Thy1.1 muizen, alvorens het dierexperiment wordt gestart.

Naast een veranderde [redacted], kan de efficiëntie van targeting verschillend zijn in beide modellen door verstoorde bloedflow of een meer systemische activatie van het endotheel door de anti-Thy1.1 antistoffen.

Om een veranderde targeting vast te kunnen stellen is dezelfde workflow nodig in zowel bijlage 1 als bijlage 2.

Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:

Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren. De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [redacted]. De anti-Thy1.1 controlegroep ontvangen [redacted] zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:

- Behandeling met E-selectine getargete SOS met daarin siRNA tegen EZH2 (E-sel-SOS-siEZH2)
- Behandeling met IgG-SOS-siEZH2 (niet getarget, wel siEZH2)

Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden gedood onder volledige anesthesie 6 uur na de [redacted] injectie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdstip wordt gekozen om de aflevering van [redacted] aan het glomerulair endotheel te onderzoeken, ten opzichte van de aflevering van de [redacted] aan het glomerulair endotheel in de controlegroep die [redacted] heeft ontvangen. Deze experimentele groepen geven ons de mate van aflevering van de verschillende [redacted] die wordt vastgesteld in de glomeruli, maar ook in de lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta, hart en andere delen van de nier.

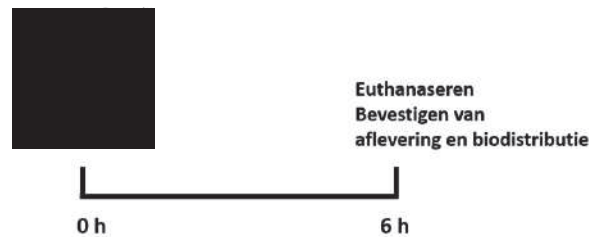
In de geïsoleerde bloed en weefsels wordt de aflevering van de [redacted] de bio-distributie en de eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. In de anti-Thy1.1 muizen zal de expressie van E-selectine op de glomerulaire endotheelcellen nog worden bepaald in archiefmateriaal alvorens het dierexperiment wordt uitgevoerd. In de glomeruli van dit muismodel vindt een ontstekingsreactie plaats, waardoor het zeer waarschijnlijk is dat de glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn en daardoor E-selectine tot expressie brengen op het celmembraan. De glomerulaire endotheelcellen worden getarget met behulp van [redacted] wordt afgeleverd

aan de glomerulaire endotheelcellen. [redacted]

[redacted] Deze lokalisatie van anti-E-selectine antilichamen wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel, en is eerder met succes uitgevoerd ([redacted])

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



### Subonderdeel 2

Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted] worden bestudeerd:

Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:

Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren.

De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [redacted]. De anti-Thy1.1 controlegroepen ontvangen [redacted]

[redacted] zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden hierbij onderverdeeld in 4 verschillende groepen:

- Behandeling met [redacted] - [redacted]
- Behandeling met [redacted] )
- Behandeling met [redacted] )
- Behandeling met [redacted] )

Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden geëthanaseerd 48 uur na de [redacted] injectie onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdstip wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligt ten opzichte van de controlegroepen die [redacted]

[redacted] hebben ontvangen. In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd wat de verlaging van EZH2 in endotheelcellen is na de behandeling met de verschillende soorten [redacted]. In de glomeruli in de nieren zal worden bepaald of de [redacted] specifiek EZH2 verlaagt in de glomerulaire endotheelcellen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



### Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp van [redacted] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen gedurende 2 weken te behandelen met als doel EZH2 te verlagen in glomerulaire endotheelcellen.

Voor dit doeleinde worden zowel anti-Thy1.1 muizen als IgG muizen gebruikt. In de experimenten worden alle anti-Thy1.1 groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd). Op de leeftijd van 5 weken worden de anti-Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren, of de muizen worden onderworpen aan een injectie met niet-reactieve IgG antistoffen als controle groep. Vanaf de dag er na worden de muizen gedurende 2 weken behandeld met [redacted] of vehicle. Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met een niet-getargete EZH2 remmer om EZH2 te verlagen uitgevoerd nadat acute proteïnurie en GS zijn geïnduceerd. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Gedurende 2 weken, worden anti-Thy1.1 muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [redacted], [redacted]. IgG muizen zullen gedurende deze 2 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit HEPES en NaCl, pH 6,7. [redacted]. De eerste injectie van [redacted] of vehicle zal 1 dag na de injectie met anti-Thy1.1 of IgG antilichamen worden toegediend. Naast de [redacted] groepen, wordt een groep anti-Thy1.1 muizen gedurende 2 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrekkelijke dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep anti-Thy1.1 muizen wordt gedurende 2 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De anti-Thy1.1 muizen worden opgedeeld in 5 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met farmacologische small molecule inhibitor van EZH2
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De IgG muizen worden behandeld met vehicle.

De benodigde dosis van [redacted] en siRNA is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in [redacted]. Tevens is na deelproject 1 en subonderdeel van huidig deelproject bekend of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 bewerkstelligt, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in dit deelexperiment zal worden gehanteerd.

De betrekkelijke dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 2 weken zien er als volgt uit:

**Op dag -1** worden de muizen onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 of niet-reactieve IgG antilichamen. De muizen zullen hierna gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie te kunnen vaststellen aan het begin van het experiment. Aan de hand hiervan kunnen we schade aan de glomerulus meten en vergelijken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment.

**Op dag 0**, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie

met [redacted] of vehicle worden gegeven. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen worden gemonitord in het bloed. De dieren zullen om de dag worden gecontroleerd op gewicht en welzijn. Iedere week, gedurende 2 weken (14 dagen), zal aan de muizen een injectie met [redacted] of vehicle worden toegediend (**op dag 0 en dag 7**) en zal bloed (100µl/25 gram lichaamsgewicht/7 dagen) worden afgenomen door middel van het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0.

**Op dag 6** zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen gedurende de interventie.

**Op dag 13** zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als meter voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee wordt bepaald of de [redacted] groep minder glomerulaire schade heeft na 2 weken van EZH2 targeting in de glomerulaire endotheelcellen, ten opzicht van de andere experimentele groepen.

**De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde anti-Thy1.1 muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [redacted]. Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 14 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.**

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE							
		Physical examination	Body weight	Injection anti-Thy1.1 / IgG	Injection vehicle/ [redacted] of inhibitor/vehicle	Blood collection	Urine collection (metabolic cage 24h)	Harvest kidney + other organs	Weigh organs and fixation/freezing
TIME (days)	-1	X	X	X			X		
	0	X	X		X	X			
	1	X	X						
	2								
	3	X	X						
	4								
	5	X	X						
	6						X		
	7	X	X		X	X			
	8	X	X						
	9								
	10	X	X						
	11								
	12	X	X						
	13						X		
14	X	X			X		X	X	

Om de rol van EZH2 in glomerulair endotheel te onderzoeken, wordt 2 weken als tijds punt aangehouden, aangezien over een langere periode (2 weken) wordt onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geremd en/of gestopt. Op een vroeger tijds punt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.



Na 2 weken worden alle muizen geëuthanaseerd, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren wordt onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. In de lever, milt en longen wordt onderzocht of hierin veel [REDACTED] terecht zijn gekomen, aangezien in deze organen veelal liposomen, zoals [REDACTED] kunnen ophopen. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [REDACTED] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

- Albumine-creatinine ratio (uitleesparameter van nierfunctie)
- Urinair elektrolyten (als maat voor nierschade)
- Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
- Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
- Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

1. Inductie van acute proteïnurie gevolgd door GS door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antilichamen.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle, [REDACTED] ) gedurende 2 weken. De benodigde dosis van SOS en siRNA wordt bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in [REDACTED]. Tevens zal na deelproject 1 en subonderdeel 1 van huidig deelproject bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 van huidig deelproject is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en -schade worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Muizen worden 3 keer gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Echter, de dieren worden alleen 3 keer in de metabole kooi gehuisvest wanneer de dieren vitaal genoeg zijn.

5. Euthanaseren 14 dagen na eerste intraveneuze injectie met [REDACTED] onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 14 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht in dit acuut model.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Subonderdeel 1:

In dit experiment wordt de aflevering van de [REDACTED] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [REDACTED] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd, om het aantal benodigde dieren te berekenen.

Aan de hand van gepubliceerde studies, [REDACTED]

[REDACTED] Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is. Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 7%
- Gewenste effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen anti-Thy1.1 muizen ([REDACTED]). Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

**2 groepen x (n=10) = 20 anti-Thy1.1 muizen**

### Subonderdeel 2:

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse. In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook E-selectine getargete [REDACTED] die siRNA bevatten werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd.

We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van [REDACTED]. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.05$
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal  $n=5$  muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom  $n=6$  muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt ([REDACTED] - [REDACTED]).

**4 groepen x (n=6) = 24 anti-Thy1.1 muizen.**

### Subonderdeel 3:

Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.

Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in anti-Thy1.1 muizen wordt de mate van glomerulosclerose aangehouden. Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 71% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8% wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: anti-Thy1.1 vehicle en [REDACTED] - [REDACTED].

Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0,05$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in glomerulosclerose: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal  $n=21$  dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom  $n=25$  muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 anti-Thy1.1 muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgesgaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de effecten en therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de mate van glomerulosclerose die wordt gemeten

in de nier weefsels.

We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Gewenste effect grootte = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.

In totaal worden 1 groep IgG muizen en 7 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt = 8 groepen

**8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 IgG muizen en 175 anti-Thy1.1 muizen).**

In totaal wordt in dit deelproject gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 2: 24 anti-Thy1.1 muizen
- Pilot: 50 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 3: 175 anti-Thy1.1 en 25 IgG muizen

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

In deze studie worden anti-Thy1.1 muizen gebruikt, welke model staan voor Focal Segmental Glomerulosclerose, waarin zich acute proteïnurie en GS ontwikkelen. In de glomerulus, op de podocyten van deze stam komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 71% van de glomeruli sclerose bevatten. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan wordt ontwikkeld en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, om de hormonale invloeden in vrouwelijke muizen op het ziekteproces te minimaliseren. In dit project zou het gebruik van vrouwelijk muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere  $n$  aan muizen benodigd zou zijn. Daarom zullen in zowel subonderdeel 1, 2 en 3 mannelijke muizen worden gebruikt.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

---

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

---

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

---

### Vervanging

Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor E-selectine tot expressie werd gebracht op het celmembraan, waarna ze zijn blootgesteld aan [REDACTED]. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress. Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.

### Verfijning

Het anti-Thy1.1 muismodel staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerose, waarbij acute proteïnurie en GS optreden. Anti-Thy1.1 muizen ontwikkelen door een eenmalige injectie versnelde proteïnurie en glomerulosclerose. Hierdoor kan de [REDACTED] interventie worden getest in een korte tijdspan, wat minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur in andere modellen. Er wordt gekozen voor een dosis van siRNA en [REDACTED] waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwacht dat geen toxiciteit wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden om de dag gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden geëuthanaseerd. Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.

Na bloedafname en injectie met [REDACTED] onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking. De muizen worden om de dag gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

### Vermindering

Voordat het experiment wordt begonnen, zal allereerst worden berekend hoeveel muizen er nodig zijn per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten van het experiment (poweranalyse). Dit aantal dieren zal worden geïncubeerd. Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke gedood worden op het tijdstip van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (2 weken ofwel 14 dagen).

---

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

---

Nadat GS is geïnduceerd door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, kan de muis licht ongerief ervaren. Ter verlichting van het ongerief als gevolg van bloedafname en toediening van [REDACTED] of vehicle onder algehele anesthesie, ontvangen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De gebruikte [REDACTED] en siRNA dosis is afgeleid uit deelproject 1, studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde

---

en gepubliceerde studies.

De muizen worden om de dag gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierversorgers van het CDP. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De muizen zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse █████ of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole kooi te worden gehuisvest.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de █████ of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van deelproject 1 en eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze onderzoeksgroep, wordt geen nier- en levertoxiciteit van de █████.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS en zullen hierdoor licht ongerief ondervinden.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse █████ of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de SOS of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

De dieren zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en geëuthanaseerd.

## J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, █████ onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

Daarnaast blijven de muizen maximaal 15 dagen in het experiment.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

De muizen worden maximaal 15 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 2:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 3:

Er wordt in de groep IgG muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

## K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De mate van ongerief door de ontwikkeling van proteïnurie en GS is licht.

De mate van ongerief door de eenmalige anti-Thy1.1 en [REDACTED] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [REDACTED] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.

Drie maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van proteïnurie en GS het gevolg is van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 injectie. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [REDACTED] en het wondje in de staart door bloedafname.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De groepen muizen zullen actief worden geëuthanaseerd 14 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren.

Hierin zullen belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer Interne RUG code **8103**
2. Titel van het project: **De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie?**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen.**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **01-06-2017**
  - aanvraag compleet: **01-06-2017**
  - in vergadering besproken: **08-01-2017**
  - anderszins behandeld: **15-08-2017**
  - termijnonderbreking(en) van / tot **13-06-2017 tot 25-07-2017**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **25-07-2017**
  - advies aan CCD: **25-08-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
**De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.**
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager  
Datum: **13-06-2017**  
**Opmerkingen/vragen**
  - **T.a.v.het projectvoorstel:**
  - 1/ Het project wordt aangemerkt als fundamenteel/translationeel. Het lijkt toch vooral fundamenteel omdat hier EHH2 als mechanisme onderzocht wordt.



- **T.a.v.bijlage 1:**
- 2/ Deel 1: Hoe wordt eigenlijk bepaald of de [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endotheel zijn afgeleverd?
- 3/ t.a.v. Deel 3: Kunnen de aanvragers beter onderbouwen wat de toegevoegde waarde van de vehicle geïnjecteerde wildtype muizen in het design is?
- 4/Onder 'J. humane eindpunten', staat: 'Er wordt niet meer uitval dan 16% in ..... muizen verwacht' (voor subonderdeel 1, 2 en 3). Waar komt die 16% vandaan?
- **T.a.v.bijlage 2:**
- 5/ Waarom wordt dezelfde workflow als in bijlage 1 weer gevolgd? Waarom moet bv deel 1 -targeting van [REDACTED] receptoren op Glomeruli- opnieuw uitgezocht worden? Dit is toch ook al bepaald in bijlage 1, deel1? Is het te verwachten dat de thy1.1 muizen zich totaal anders gedragen?
- 6/ Onder 'J. humane eindpunten', staat: 'Er wordt niet meer uitval dan 16% in ..... muizen verwacht' (voor subonderdeel 1, 2 en 3). Waar komt die 16% vandaan?
- **T.a.v. de proefopzet/statistiek:**
- 7/ Op zich wordt heel netjes vermeld dat een power analyse gedaan wordt om het daadwerkelijk benodigde aantal dieren goed in te kunnen schatten, maar nergens is te zien dat er extra dieren worden gereserveerd om dat te doen. Het lijkt de DEC dat men voor beide bijlagen een pilot voorafgaande aan subonderdeel 1 zou moeten doen om een indicatie van de effect size te krijgen?
- 8/ Verder vindt de DEC de n=25 vrij lastig te volgen aangezien er vrij weinig parameters in het stuk gedefinieerd zijn. Het is op dit moment niet in te schatten of dit een realistisch aantal is, zonder meer details in een rekenvoorbeeld te zien.
- 9/ Een additionele opmerking over subonderdeel 3: dat is het tussentijds her bepalen van de power/sample size. De DEC ziet het liefst zo min mogelijk tussentijdse analysis en zou zeker niet op basis van n=3 de sample size opnieuw berekenen. Dat lijkt ook niet nodig: uit de voorafgaande experimenten zou redelijk duidelijk te bepalen moeten zijn wat de sample size moet zijn.
- 'Mean + StDev' in de controle groep is bekend uit eerdere experimenten. 'Mean' van de test groep volgt uit het minimale relevante effect. Enige wat onbekend is, is de variantie in de experimentele groep. Daar zal een assumptie voor gedaan moeten worden.
- 10/ Er zit nog 1 onvolkomenheid in bijlage 2, waarbij eerst met n=6 wordt gerekend (subonderdeel 1) wat later weer n=10 blijkt te zijn. De DEC neemt aan dat dit ook n=10 moet zijn. Verder zou nog de beoogde power en alpha toevoegd moeten worden.

- Datum antwoord: **25-07-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

**1/** In dit project wordt de bijdrage van EZH2 aan de ontwikkeling en progressie van glomerulosclerose onderzocht alsook de mechanismen wordt geprobeerd te identificeren waarbinnen EZH2 een belangrijke rol speelt. Deze kennis is voornamelijk fundamenteel. De uitkomsten van deze studie kunnen mogelijk leiden tot meer translationele vervolgvragen. Derhalve nemen we het advies van de DEC over om dit project enkel als fundamenteel onderzoek aan te duiden.

**2/** Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. We hebben reeds vastgesteld in het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel voor diabetische glomerulosclerose dat E-selectine tot expressie komt op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcellen. In dit project worden de glomerulaire endotheelcellen getarget met behulp van [REDACTED]

[REDACTED] aan de glomerulaire endotheelcellen kan worden vastgesteld door de E-selectine antilichamen aan te tonen in de weefsels van de BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen. Deze lokalisatie van anti-E-selectine antilichamen wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel, en is eerder met succes uitgevoerd

**3/** In dit project zullen muizen worden geïnjecteerd met [REDACTED], welke zich in vloeistof bevinden. Het injecteren van vloeistof kan echter leiden tot hypervolume en derhalve nierschade veroorzaken. Aan het einde van het experiment zullen de nierfunctie waarden van de behandelde BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden vergeleken met de nierfunctiewaarden van BTBR<sup>wt/wt</sup> controle muizen. Mogelijke volume-afhankelijke veranderingen in nierfunctie kunnen we controleren door de BTBR<sup>wt/wt</sup> als vehicle controle mee te nemen in het experiment.

**4/** In bijlage 1 van huidig project zullen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden gebruikt. Uit eerdere studies binnen het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel is gebleken dat de uitval varieert tussen 10-15%. Om op hele aantallen muizen uit te komen voor de uitval, werd 16% aangehouden in plaats van 15%. Om uit te gaan van percentages in plaats van aantallen, wordt derhalve 15% aangehouden. [REDACTED]

Daarom wordt binnen alle experimentele groepen een uitval van maximaal 15% verwacht. Naast de uitval van de BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, is tevens de uitval van de BTBR<sup>wt/wt</sup> controle muizen aangepast. Een muis kan ziek worden door toeval of door een kooigenoot aangevallen worden en gewond raken. Onder deze omstandigheden zal een muis daarom uit de proef moeten worden genomen. Om deze reden wordt de uitval van BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen geschat op 0-5%.

**5/** In bijlage 1 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose onderzocht in een chronische model, namelijk BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel. Deze muizen ontwikkelen glomerulosclerose door een genetische verandering. In bijlage 2 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose in een acuut model onderzocht, namelijk het anti-Thy1.1 muismodel. Deze muizen worden geïnjecteerd met anti-Thy1.1 antistoffen waardoor glomerulosclerose ontstaat.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose in deze modellen door andere stimuli veroorzaakt wordt, kan de activatie van glomerulaire endotheelcellen verschillend kan zijn in beide modellen. Dit kan een andere expressie van E-selectine op het glomerulaire endotheel ten gevolge hebben, waardoor de targeting anders kan zijn.

Naast een veranderde E-selectine expressie, kan de efficiëntie van targeting anders zijn in beide modellen door verstoorde bloedflow of een meer systemische activatie van het endotheel door de anti-Thy1.1 antistoffen.

Om een veranderde targeting vast te kunnen stellen is dezelfde workflow nodig in zowel bijlage 1 als bijlage 2.

De aflevering van [REDACTED] is te relateren aan de mate van E-selectine expressie. De E-selectine expressie kan model-afhankelijk zijn waardoor de targeting voor ieder model moet worden uitgezocht.

**6/** In bijlage 2 van huidig project zullen anti-Thy1.1 muizen worden gebruikt. Uit eerdere studies binnen het anti-Thy1.1 muismodel is gebleken dat de uitval varieert tussen 10-15%. Om op hele aantallen muizen uit te komen voor de uitval, werd 16% aangehouden in plaats van 15%. Om uit te gaan van percentages in plaats van aantallen, wordt derhalve 15% aangehouden. [REDACTED]

[REDACTED] Daarom wordt binnen alle experimentele groepen een uitval van maximaal 15% verwacht.

Naast de uitval van de anti-Thy1.1 muizen, is tevens de uitval van de IgG controle muizen aangepast. Een muis kan ziek worden door toeval of door een kooigenoot aangevallen worden en gewond raken. Onder deze omstandigheden zal een muis daarom uit de proef moeten worden genomen. Om deze reden wordt de uitval van IgG muizen geschat op 0-5%.

**7/** Wij zijn het eens dat een pilot een goede manier is om een indicatie van de effect size te krijgen. Voor een pilot moet echter bekend zijn of de SOS aan de glomerulaire endotheelcellen worden afgeleverd en of een verlaging van EZH2 wordt bewerkstelligd.

Subonderdeel 1 heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [REDACTED] te bestuderen. In subonderdeel 2 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [REDACTED]. Subonderdeel 3 heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [REDACTED]. [REDACTED] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens glomerulosclerose te onderzoeken. Subonderdeel 3 kan alleen worden uitgevoerd wanneer bekend is dat [REDACTED] specifiek worden afgeleverd aan de glomerulaire endotheelcellen en deze een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen.

Daarom is het essentieel eerst subonderdelen 1 en 2 uit te voeren, waarna een pilot wordt uitgevoerd als basis voor een powerberekening van subonderdeel 3. Voor het uitvoeren van deze pilot zijn extra dieren nodig, zoals hieronder omschreven:

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groepen muizen per bijlage: BTBR<sup>ob/ob</sup> vehicle en BTBR<sup>ob/ob</sup> [REDACTED] voor bijlage 1. Anti-Thy1.1 vehicle en anti-Thy1.1 [REDACTED] voor bijlage 2.

Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen wordt de albumine-creatinine ratio aangehouden. In anti-Thy1.1 muizen wordt als primaire uitkomstmaat de mate van glomerulosclerose aangehouden.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR<sup>ob/ob</sup> een albumine-creatinine ratio (ACR) hebben van gemiddeld 850 µg/mg en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680 µg/mg. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 71% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8% wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0,95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in ACR/glomerulosclerose: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen.** In totaal worden in bijlage 2 2 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 anti-Thy1.1 muizen.**

**8/** In diabetische nefropathie is de belangrijkste klinische parameter de albumine-creatinine ratio (ACR). Derhalve is dit de parameter die als primaire uitkomstmaat wordt aangehouden in dit project. Andere readouts zijn onder andere blood urea nitrogen, urine elektrolyten en plasma NGAL en KIM-1. Deze readouts worden echter als secundair eindpunt gebruikt.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR<sup>ob/ob</sup> een albumine-creatinine ratio (ACR) hebben van 850 µg/mg en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680 µg/mg. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

In het anti-Thy1.1 muismodel voor acute proteinurie en glomerulosclerose wordt als primaire uitkomstmaat de mate van glomerulosclerose aangehouden. Ook in bijlage 2, betreffende het experiment met dit muismodel, worden onder andere ook blood urea nitrogen, urine elektrolyten en plasma NGAL en KIM-1 gemeten. Deze readouts worden echter als secundair eindpunt gebruikt. Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 70% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8 wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Effect grootte in ACR/glomerulosclerose = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 1 groep BTBR<sup>wt/wt</sup> en 5 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> gebruikt = 6 groepen

In totaal worden 1 groep BTBR<sup>wt/wt</sup> en 5 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> gebruikt = 6 groepen.

**6 groepen x (n=25) = 150 muizen (25 BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen en 125 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen).**

n totaal worden 1 groep IgG-muizen en 5 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt = 6 groepen.

**6 groepen x (n=25) = 150 muizen (25 IgG muizen en 125 anti-Thy1.1 muizen)**

De aangepaste passages in de CCD aanvraag omtrent de hierboven beschreven poweranalyse voor subonderdeel 3, kunt u vinden in de beantwoording van opmerking 7.

**9/**In huidig project worden 3 subonderdelen gehanteerd. Subonderdeel 1 heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [REDACTED] te bestuderen. In subonderdeel 2 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [REDACTED] onderzocht. Subonderdeel 3 heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [REDACTED] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens glomerulosclerose te onderzoeken. Subonderdeel 3 kan alleen worden uitgevoerd wanneer bekend is dat [REDACTED] specifiek worden afgeleverd aan de glomerulaire endotheelcellen én deze een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen.

Naar aanleiding van opmerking 7 is besloten dat het essentieel is een pilot experiment uit te voeren om de sample size te kunnen berekenen middels een poweranalyse. Deze pilot zal daarom worden uitgevoerd voordat subonderdeel 3 wordt gestart en nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zodat de aflevering van [REDACTED] en verlaging van EZH2 door [REDACTED] zijn vastgesteld in glomerulaire endotheelcellen. De pilot wordt gebruikt als basis voor een powerberekening voor het benodigde aantal dieren in subonderdeel 3, waardoor geen interim analyse wordt uitgevoerd.

De in de CCD aanvraag ingevoegde passages voor het pilot experiment, kunt u vinden in de beantwoording van opmerking 7. De passages waarin de interim analyse was beschreven, zijn verwijderd uit de CCD aanvraag.

**10/** In subonderdeel 1 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [REDACTED] bestudeerd. Het aantal muizen voor dit subonderdeel wordt geschat op maximaal 10 muizen per groep.

Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook [REDACTED] werden gebruikt, werd een verschil van 70% in aflevering geobserveerd tussen [REDACTED]. We stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen [REDACTED]. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 7%
- Effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> [REDACTED] zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

**groepen x (n=10) = 20 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen**

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen anti-Thy1.1 ( ) zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uitkomt op 2 muizen per groep:

**2 groepen x (n=10) = 20 anti-Thy1.1 muizen**

In subonderdeel 2 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door onderzocht. We willen minimaal 50% reductie bereiken in expressie van EZH2. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de SD 25% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR<sup>ob/ob</sup> en anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep is daarom n=6 muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt

**4 groepen x (n=6) = 24 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen.**

In totaal worden 4 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt

**4 groepen x (n=6) = 24 anti-Thy1.1 muizen.**

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

**10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

- 1.** Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **Ja**  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*
- 2.** De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning. **Nieuwe aanvraag**
- 3.** Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
- 4.** Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.v.t.**

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

**Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.**

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

**Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen**

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

*Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**Het directe doel van dit project is om kennis te vergaren over de invloed van epigenetische regulatie d.m.v. Enhancer of Zeste homolog 2 op de ontwikkeling van glomerulosclerose.**

**Het uiteindelijke doel is om de vergaarde kennis toe te passen in de behandeling of preventie van glomerulosclerose bij nierziekten en/of nierschade.**

**Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel onderzoek m.b.t. het hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.**

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

**De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project zijn de proefdieren, en mensen.**

**Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan voornamelijk als gevolg het toedienen van diverse substanties en het huisvesting in metabole kooien. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.**

**Waarden die voor mensen bevorderd worden: Er wordt nieuwe kennis vergaard over de rol van EZH2 in glomerulosclerose. Deze kennis is nodig voor het begrijpen van deze processen. Op de lange termijn kan dit mogelijk leiden tot de ontwikkeling van behandelingen voor deze aandoening, waardoor gezondheid en kwaliteit van leven van mensen verbeterd worden.**

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

**Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.**

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

**Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC ziet geen reden om aan te nemen dat het projectvoorstel niet aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten. Het project bevat geen hiaten die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.**

*Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor



voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**

- 10.** Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**
- 11.** Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
- 12.** Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door het induceren van nierfalen, het toedienen van stoffen en opoffering.**
- 13.** Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC zijn de criteria voor humane eindpunten in deze aanvraag goed beschreven.**

3V's

- 14.** Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor het onderzoeken van epigenetische regulatie mechanismen in de context van glomerulosclerose zijn in vitro of ex vivo niet na te bootsen.**
- 15.** Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar Naar**

**de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties en power analyses.**

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. *Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

**Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.**

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*). **In onderhavige projectaanvraag wordt gebruik gemaakt van mannelijke muizen omdat de variatie in de relevante uitleesparameters veel groter is in vrouwelijke muizen. De aanvrager heeft naar de mening van de DEC voldoende onderbouwd waarom in dit project alleen mannelijke muizen gebruikt worden. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.**
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. Dieren worden gedood om weefsels en te kunnen uitnemen en bestuderen, dit is een essentieel voor het beantwoorden van de vragen in dit project. De dieren worden gedood volgens een in bijlage 4 vermelde dodingsmethode.**
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?  
**Naar de mening van de DEC is zulks het geval.**



#### **D. Ethische afweging**

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project '**De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie??**', Dat zich erop richt om in muizen kennis te vergaren over de rol van epigenetische regulatie d.m.v. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) in het ontstaan van glomerulosclerose, het lichte tot matige ongerief dat de proefdieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht tot matig ongerief**.  
Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **mogelijk substantieel voordeel**.

De DEC-RUG is van mening dat in het project '**De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie??**' de belangen van de samenleving zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd. De betrokken proefdieren zullen in dit project licht en in sommige gevallen matig ongerief ondervinden, gevolgd door opoffering. Zij worden in hun welzijn geschaad door het induceren van nierfalen, het toedienen van stoffen middels injecties en huisvesting in metabole kooien, gevolgd door opoffering worden aangetast.

Glomerulosclerose (GS) is littekenvorming op de glomeruli in de nieren. GS kan ontstaan bij diverse nieraandoeningen en draagt bij aan nierfalen. Dit project beoogt de rol van het enzym EZH2 in glomerulosclerose te onderzoeken. De aanvragers hebben eerder al laten zien dat EZH2 expressie in glomerulaire endotheelcellen verhoogd is bij GS. EZH2 zorgt voor epigenetische regulatie van genexpressie van genen die betrokken zijn bij de functie van endotheelcellen. De hypothese is dat een verhoogd EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen de ontwikkeling en progressie van zowel chronische GS als acute GS veroorzaakt hetgeen leidt tot proteïnurie. In dit project wordt deze hypothese getoetst door de expressie van EZH2 (in de glomeruli) te blokkeren/verminderen door het toedienen van interference RNA (Si-RNA) tegen EZH2 in twee muismodellen. 1) een chronisch model voor GS( De BTBRob/ob muis) en 2 een acuut model voor GS en proteïnurie (Thy1.1 muizen behandeld met anti-Thy1.1 antilichamen).

Nierfalen (als gevolg van GS) in mensen zorgt voor veel problemen, en vermindering van kwaliteit van leven. Een goede behandeling is er op dit moment nog niet. Het vergaren van kennis over EZH2 als aangrijpingsmechanisme voor een mogelijke behandeling is daarom nuttig en kan in de toekomst leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor GS. De aanvragers hebben een trackrecord in dit onderzoeksveld en ervaring met de voorgestelde methoden en diersmodellen. Naar de mening van de DEC is de kans op succesvolle uitvoering van het voorgestelde onderzoek groot. De wetenschappelijke en in het verlengde daarvan wellicht maatschappelijke opbrengsten zijn goed omschreven en wegen naar het oordeel van de DEC op tegen het aantal dieren dat gebruikt gaat worden en het lichte ongerief dat de dieren zal worden aangedaan. Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht.

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project '**De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie??**', het lichte tot matige ongerief, gevolgd door opoffering, dat de dieren wordt aangedaan, in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder. De DEC-RUG is van mening dat de voorgestelde

experimentele opzet en uitkomstparameters aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering verfijning en vervanging. Dit blijkt onder andere uit de uitgebreide implementatie van go no-go momenten, uitvoering van pilot experimenten en het gebruik van weefsels uit bestaande bio-banken waar mogelijk. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd. Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RUG het voorgestelde project [REDACTED], als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

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

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.**

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

**Er zijn geen grote knelpunten naar voren gekomen bij het beoordelen van deze aanvraag.**

**De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD1050020173184

**Bijlagen**

2

Datum 28 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2017. Het gaat om uw project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020173184. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

28 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1050020173184

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
28 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1050020173184

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 1179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
28 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1050020173184

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 augustus 2017  
Geplande einddatum: 1 juni 2022  
Titel project: De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.287,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Groningen  
Datum: 25 augustus 2017

**Datum:**  
28 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1050020173184



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD1050020173184

**Bijlagen**

2

Datum 28 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 28 augustus 2017

Vervaldatum: 27 september 2017

Factuurnummer: 173184

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020173184	€ 1.287,00

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



**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 13 september 2017 11:44  
**Aan:** Info-zbo  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vragen bij de behandeling van AVD1050020173184  
**Bijlagen:** 2017-09-13 NTS.docx; 2017-09-13 bijlage\_DP2\_Thy1.1 model.docx; 2017-09-13 bijlage\_DP1\_BTBR model.docx; 2017-09-13 Antwoorden op vragen CCD.docx  
**Categorieën:** Dossier: [REDACTED] Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Op 30 augustus j.l. stuurde u onderstaande mail met vragen van de CCD op mijn ingediende aanvraag. Hierbij stuur ik u de antwoorden en aangepaste passages én de aangepaste documenten. Alle documenten zijn bijgevoegd in de bijlage.

Vriendelijk groet,

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]  
**Verzonden:** woensdag 30 augustus 2017 16:40  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vragen bij de behandeling van AVD1050020173184

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend en bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen. Het betreft uw project: 'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie' met aanvraagnummer AVD1050020173184.

Kunt u meer inzicht geven welk aantal dieren welk ongerief zullen ondervinden? Wij komen uit op 15% licht en 85% matig. Is dit correct?

Onder punt L. in de bijlagen beschrijft u alleen de dieren die langer in proef zitten, niet de dieren die na 6 of 48 uur gedood worden.

In de NTS staat dat de dieren om de dag worden gecontroleerd. Het is verplicht dit dagelijks te doen.

Kunt u de beschrijving van de 3V's in de NTS meer aansluiten op de 3V's in het projectvoorstel? U doet bijvoorbeeld werk in celkweken, dat staat niet in de NTS genoemd.

Kunt u de aangepaste formulieren aan ons toesturen voor 15 september?

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than

the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

Geachte CCD,

Hieronder is de door u verzonden mail met vragen/opmerkingen getoond. Onder deze mail zijn de antwoorden/aangepaste passages naar aanleiding van deze vragen/opmerkingen beschreven:

Geachte mevrouw,

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend en bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen. Het betreft uw project: 'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie' met aanvraagnummer AVD1050020173184.

**Kunt u meer inzicht geven welk aantal dieren welk ongerief zullen ondervinden? Wij komen uit op 15% licht en 85% matig. Is dit correct?**

**Onder punt L. in de bijlagen beschrijft u alleen de dieren die langer in proef zitten, niet de dieren die na 6 of 48 uur gedood worden.**

**In de NTS staat dat de dieren om de dag worden gecontroleerd. Het is verplicht dit dagelijks te doen.**

**Kunt u de beschrijving van de 3V's in de NTS meer aansluiten op de 3V's in het projectvoorstel? U doet bijvoorbeeld werk in celweken, dat staat niet in de NTS genoemd.**

Hieronder zijn de antwoorden/aangepaste passages (in rood weergegeven) naar aanleiding van de hierboven genoemde vragen beschreven:

Vraag 1:

**Kunt u meer inzicht geven welk aantal dieren welk ongerief zullen ondervinden? Wij komen uit op 15% licht en 85% matig. Is dit correct?**

Antwoord op vraag 1:

De percentages zijn correct.

De mate van ongerief door de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie, glomerulosclerose is licht.

De mate van ongerief door de eenmalige ■■■ injectie is geschat als licht. De wekelijkse ■■■ of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.

Vier maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

De dieren in subonderdeel 1 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 20 dieren.

De dieren in subonderdeel 2 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 24 dieren.

De dieren in de pilot zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 50 dieren.

De dieren in subonderdeel 3 zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 200 dieren.

In totaal ervaren 44 dieren licht ongerief (15% van de dieren) en 250 dieren matig ongerief (85% van de dieren).

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie en GS het gevolg is van de genetische achtergrond van de muizen. De muizen zullen naar

verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [REDACTED] en het wondje in de staart door bloedafname.

**Vraag 2:**

**Onder punt L. in de bijlagen beschrijft u alleen de dieren die langer in proef zitten, niet de dieren die na 6 of 48 uur gedood worden.**

**Antwoord op vraag 2:**

In subonderdeel 1 zullen de muizen worden gedood 6 uur na de injectie met de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren zullen de aflevering en bio-distributie van de [REDACTED] in de verschillende experimentele groepen worden bepaald.

In subonderdeel 2 zullen de muizen worden gedood 48 uur na de injectie met de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren wordt de verlaging van EZH2 in de endotheelcellen na behandeling met de verschillende soorten [REDACTED] bepaald.

In subonderdeel 3 zullen de groepen muizen worden gedood 28 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. Hierin zullen serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

Vraag 3:

**In de NTS staat dat de dieren om de dag worden gecontroleerd. Het is verplicht dit dagelijks te doen.**

Antwoord op vraag 3:

In dit project worden de volgende humane eindpunten gehanteerd en gewaarborgd:

- Gewichtsverlies van meer dan 20%. De dieren worden om de dag gewogen.
- Extra ongerief door condities niet gerelateerd aan het experiment, zoals wondjes en infecties. **Het welzijn wordt dagelijks gecontroleerd.**
- Te hoog niveau bloedglucose door diabetes. Dit wordt wekelijks gemeten.
- Te hoge totaal score voor kenmerken van algeheel ongerief, zoals activiteit, wassen, rillen en vachtstructuur. Het gedrag en welzijn wordt **dagelijks** geobserveerd en bijgehouden.

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

Vraag 4:

**Kunt u de beschrijving van de 3V's in de NTS meer aansluiten op de 3V's in het projectvoorstel? U doet bijvoorbeeld werk in celkweken, dat staat niet in de NTS genoemd.**

Antwoord op vraag 4:

#### **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Voordat wordt begonnen aan deze dierstudie is de gestelde hypothese al met succes getest op glomerulaire endotheelcellen in het laboratorium.

Er bestaat geen alternatief model voor de ontwikkeling van glomerulosclerose.

#### **Verfijning**

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

1. Een speciale muizenstam (BTBR obese muizen) ontwikkelt spontaan glomerulosclerose zoals bij de mens, in tegenstelling tot chemische modellen. Dit model bootst humane chronische glomerulosclerose het beste na. **De muizen ontwikkelen glomerulosclerose in een relatief korte tijdsduur, waardoor interventie kan worden getest in een korte tijdspan.**
2. Muizen van een andere muizenstam (anti-Thy 1.1) ontwikkelen door een injectie versneld proteïnurie en glomerulosclerose. Deze stam is geschikt om glomerulosclerose in een korte tijdspan te onderzoeken. Dit model is het meest specifiek in de ontwikkeling van acute proteïnurie en glomerulosclerose.

Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebrafish of fruitvlieg.

#### 4.2 **Vermindering**

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

Er wordt verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt door:

1. Statistische berekeningen vooraf
2. Pilot experiment
3. Stapsgewijze uitvoering van experimenten (tevorens vastgestelde go/no go beslismomenten)
4. **Er wordt alleen gekozen voor inclusie van muizen die worden gedood op het tijdstip van interventie waarop een mogelijk effect kan worden gemeten.**



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

Volgnummer	Type dierproef
1	Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In dit project worden twee verschillende groepen muizen gebruikt: (a) BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen en (b) BTBR<sup>wt/wt</sup> (erkende leverancier):

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (8-20 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen betreffen een model in de BTBR (black and tan, brachyuric) muis. Deze muizen hebben een ob/ob leptine-deficiëntie mutatie en ontwikkelen hierdoor diabetes mellitus type 2 (DMT2), waaronder hyperglycemie en insuline resistentie. Vanaf week 4 ontstaat proteïnurie en vanaf week 8 glomerulosclerose (GS), verlittekening van de filters in de nier (de glomeruli). Na 20 weken zijn glomerulaire laesies aanwezig, die vergelijkbaar zijn met humane GS in diabetische nefropathie. Er is gekozen voor dit model omdat de BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen spontaan glomerulosclerose (GS) ontwikkelen, hetgeen de GS in de humane situatie het best reflecteert. BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen ontwikkelen diabetische nefropathie met chronische GS in een relatief korte tijdsduur, waardoor dit model zeer geschikt is om de hieronder beschreven interventiestudie te toetsen in een (relatief) korte tijdspan. In de literatuur is het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel een gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om diabetische nefropathie en daarmee chronische GS te bestuderen. BTBR<sup>wt/wt</sup> wordt gebruikt als (niet-diabetische) controle voor BTBR<sup>ob/ob</sup>.

Uit eigen preliminaire data is gebleken dat tijdens diabetische nefropathie in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen het endotheel is geactiveerd/beschadigd en daardoor het adhesie molecuul E-selectine tot expressie wordt gebracht op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcel. [REDACTED]

[REDACTED] specifiek aan de geactiveerde/beschadigde endotheelcellen in de glomerulus worden afgeleverd. Als controle voor



endothelcel-specifieke aflevering van [REDACTED].

### Subonderdeel 1

Dit onderdeel heeft als doel de glomerulaire endothelcel-specifieke aflevering van [REDACTED] biodistributie en de eventuele nier- en levertoxiciteit in diabetische nefropathie te bestuderen.

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt:

De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [REDACTED]. De BTBR<sup>ob/ob</sup> controlegroep ontvangt [REDACTED], zoals hieronder beschreven:

BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:

- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]

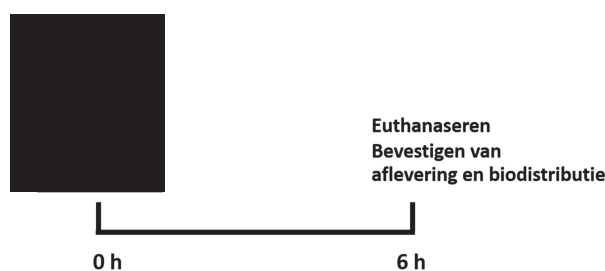
Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De groepen muizen worden 6 uur na de [REDACTED] injectie gedood onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In het geïsoleerde bloed en weefsels wordt de aflevering van de [REDACTED] de bio-distributie en eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endothel zijn afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

Wanneer glomerulaire endothelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endothelcellen. We hebben reeds vastgesteld in het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel dat E-selectine tot expressie komt op het celmembraan van de glomerulaire endothelcellen. De glomerulaire endothelcellen worden getarget met behulp van [REDACTED]

[REDACTED] antilichamen aan te tonen in de weefsels van de BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen. Deze lokalisatie van [REDACTED] wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endothelcellen. Deze techniek is operationeel en is eerder met succes uitgevoerd [REDACTED]

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



### Subonderdeel 2

Wanneer [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endothel worden afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endothelcel-specifieke verlagings van EZH2 door [REDACTED] worden bestudeerd:

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt:

De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [REDACTED], zoals hieronder beschreven:

BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden hierbij opgedeeld in 4 verschillende groepen:

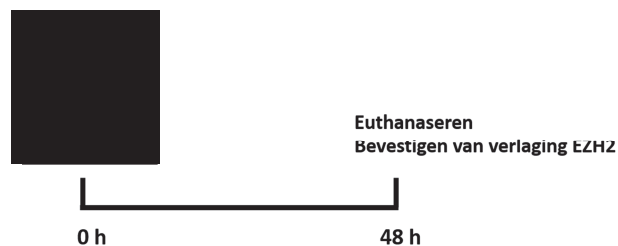
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]

- Behandeling met [REDACTED]  
Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De muizen worden 48 uur na de [REDACTED] injectie gedood onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd of een verlaging van EZH2 in endotheelcellen plaatsvindt na behandeling met de verschillende soorten [REDACTED]

Dit tijdstip wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [REDACTED] een verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen ten opzichte van de controlegroepen die [REDACTED] hebben ontvangen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



### Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [REDACTED] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen te behandelen met als doel EZH2 chronisch (gedurende 4 weken) te verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen.

Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met niet-getargere EZH2 remmer uitgevoerd om EZH2 te verlagen. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Voor dit doeleinde worden zowel BTBR<sup>ob/ob</sup> als BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen gebruikt. In de experimenten worden alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen aan elkaar gematched aan de hand van de mate van proteinurie, leeftijd (8-20 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

Gedurende 4 weken, worden BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [REDACTED]. BTBR<sup>wt/wt</sup> zullen gedurende deze 4 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit HEPES en NaCl, pH 6,7. Dit is de buffer waarin de [REDACTED] zich bevinden. De eerste injectie zal plaatsvinden wanneer de muizen tussen 8 weken en 20 weken oud zijn.

Naast de [REDACTED] groepen, wordt een groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gedurende 4 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betreffende dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen wordt gedurende 4 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden onderverdeeld in 7 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met farmacologische small molecule inhibitor van EZH2
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen worden behandeld met vehicle.

De BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden geïnjecteerd met [REDACTED] welke zich in 100 µl vloeistof bevinden. Het injecteren van vloeistof kan leiden tot hypervolume en derhalve nierschade veroorzaken. Aan het einde van het experiment zullen de nierfunctie waarden van de behandelde BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen worden vergeleken met de nierfunctiewaarden van BTBR<sup>wt/wt</sup> controle muizen. Mogelijke volume-afhankelijke veranderingen in nierfunctie kunnen worden gecontroleerd door de BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen als vehicle-controle mee te nemen in het experiment.

De benodigde dosis van [REDACTED] en siRNA is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze vakgroep [REDACTED]). Tevens zal na uitvoering van subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na uitvoering van subonderdeel 2 zal bekend zijn of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd. Als dit het geval is, betekent dit dat de gebruikte dosis in de subonderdelen 1 en 2 ook in dit subonderdeel 3 zal worden gehanteerd. Indien de gehanteerde dosis niet afdoende is, zal een 10-voudige dosis worden getoetst als beschreven in subonderdeel 2.

De betrekkelijke dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 4 weken zien er als volgt uit:

**Op dag -7** (Zeven dagen vóór de eerste injectie met SOS), zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie te kunnen vaststellen voor aanvang van het experiment. Aan de hand hiervan kan schade aan de glomeruli worden gemeten, wat zal worden vergeleken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment. Ook worden aan de hand van deze proteïnurie waarden op dag -7, de BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen ingedeeld, waardoor de proteïnurie in iedere BTBR<sup>ob/ob</sup> groep gemiddeld gelijk is.

**Op dag 0**, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie met [REDACTED] of vehicle worden gegeven. De BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen zijn zwaarder, waardoor bij deze muizen ongeveer 150µl zal worden afgenomen. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen wekelijks worden gemonitord in het bloed. De gezondheidsstatus van de dieren zal dagelijks worden gemonitord.

Iedere week, gedurende 4 weken (28 dagen), zal aan de muizen een injectie met [REDACTED] of vehicle worden toegediend (**op dag 0, dag 7, dag 14 en dag 21**) en zal bloed worden afgenomen door middel van het wondje in de staart door het knipje in de staart op dag 0.

**Op dag 6 en 13** zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen om op deze manier de ontwikkeling en progressie van GS gedurende de interventie te kunnen monitoren.

**Op dag 27** zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee kan worden bepaald of de [REDACTED] groep minder glomerulaire schade heeft na het targeten van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen gedurende 4 weken, ten opzicht van de andere experimentele groepen.

**De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [REDACTED]. Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 28 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.**

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE						
		Physical examination	Body weight	Injection vehicle/ [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] or inhibitor/vehicle	Blood collection	Urine collection (metabolic cage 24h)	Harvest kidney + other organs	Weigh organs and fixation/freezing
TIME (days)	-7	X	X			X		
	-6	X	X					
	-5	X						
	-4	X	X					
	-3	X						
	-2	X	X					
	-1	X						
	0	X	X	X	X			
	1	X						
	2	X	X					
	3	X						
	4	X	X					
	5	X						
	6	X	X			X		
	7	X	X	X	X			
	8	X	X					
	9	X						
	10	X	X					
	11	X						
	12	X	X					
	13	X				X		
	14	X	X	X	X			
	15	X	X					
	16	X						
	17	X	X					
	18	X						
	19	X	X					
	20	X						
21	X	X	X	X				
22	X	X						
23	X							
24	X	X						
25	X							
26	X	X						
27	X				X			

	28	X	X		X		X	X
--	----	---	---	--	---	--	---	---

Om de rol van EZH2 in het glomerulair endotheel tijdens GS te onderzoeken, wordt 4 weken als tijds punt aangehouden, aangezien over een langere periode (4 weken) zal worden onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geïnhibeerd en/of gestopt. Op een vroeger tijds punt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 4 weken worden alle muizen gedood, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren zal worden onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. In de lever, milt en longen wordt onderzocht of hierin veel ███ terecht zijn gekomen, aangezien in deze organen veelal liposomen, zoals ███ kunnen ophopen. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de ███ en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2 en eventueel een effect hebben gehad op de gevolgen van diabetes mellitus type 2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

1. Albumine-creatinine ratio (primaire uitleesparameter van nierfunctie)
2. Plasma glucose en insuline (als maat voor DMT2 in de muizen)
3. Urine glucose
4. Urine elektrolyten (als maat voor nierschade)
5. Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
6. Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
7. Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

1. Spontane inductie van GS door genetische achtergrond in BTBR<sup>ob/ob</sup>. Dit is in de literatuur een van de meest gangbare en gestandaardiseerde modellen voor diabetische nefropathie en daardoor chronische GS.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle of ███ gedurende 4 weken. De benodigde dosis van ███ en siRNA is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze onderzoeksgroep ███ Tevens zal na subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en -schade en de status van diabetes mellitus type 2 worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Gedurende 35 dagen zullen de muizen vier keer worden gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Voorafgaand aan huisvesting in metabole kooien wordt door middel van gedragsobservaties en lichaamsgewichtsbepaling vastgesteld dat de dieren in staat zijn een metabole kooi experiment te ondergaan.

5. Doden 28 dagen na eerste intraveneuze injectie, onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 28 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Subonderdeel 1:

In dit experiment wordt de aflevering van de ███ in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de ███ daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd om het aantal benodigde dieren te berekenen.

Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook ███ bevatten werden gebruikt, werd een verschil van 70% in aflevering geobserveerd tussen ███ . We stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen ███ . Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 7%
- Effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> ( ) zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

**2 groepen x (n=10) = 20 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen**

#### Subonderdeel 2:

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse. In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen vakgroep, waarbij ook bevatten werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd. We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van . Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom n=6 muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt ( )

**4 groepen x (n=6) = 24 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen.**

#### Subonderdeel 3:

Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.

Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen wordt de mate van albumine-creatinine ratio (ACR) aangehouden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR<sup>ob/ob</sup> een albumine-creatinine ratio hebben van gemiddeld 850  $\mu\text{g}/\text{mg}$  en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: BTBR<sup>ob/ob</sup> vehicle en BTBR<sup>ob/ob</sup> . Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0,95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in ACR: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgegaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse. Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de Albumine-Creatinine ratio die wordt gemeten in de urine.

We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal  $n=25$  muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.05$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Effect grootte in ACR = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal  $n=21$  muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR<sup>ob/ob</sup> groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom  $n=25$  muizen benodigd.

In totaal worden 1 groep BTBR<sup>wt/wt</sup> en 7 groepen BTBR<sup>ob/ob</sup> gebruikt = 8 groepen.

**8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen en 175 BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen).**

In totaal worden in dit deelproject maximaal gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 BTBR<sup>ob/ob</sup>
- Subonderdeel 2: 24 BTBR<sup>ob/ob</sup>
- Pilot: 50 BTBR<sup>ob/ob</sup>
- Subonderdeel 3: 175 BTBR<sup>ob/ob</sup> en 25 BTBR<sup>wt/wt</sup>

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

In deze studie worden type BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen gebruikt, welke door een leptine-deficiëntie mutatie diabetes mellitus type 2 (DMT2) ontwikkelen en daardoor diabetische nefropathie met chronische GS. Deze stam ontwikkelt spontaan GS, waardoor GS niet geïnduceerd hoeft te worden middels aanvullende interventie. De achtergrond van deze muis is BTBR (black and tan, brachyuric). BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen zijn dezelfde muisstam als BTBR<sup>ob/ob</sup>, maar hebben geen leptine-deficiëntie mutatie in het genoom en daarom vanzelfsprekend geen DMT2, proteïnurie en GS, waardoor deze muis als (niet-diabetische) controle wordt gehanteerd.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, doordat de proteïnurie in de vrouwelijk BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen niet stijgt, maar fluctueert tussen week 8 en week 16 (Hudkins et al, J American Soc Nephrol, 2010). Mannelijke muizen laten tot en met week 20 een stijging in proteïnurie zien. Doordat als primaire uitleesparameter proteïnurie (ACR) wordt gehanteerd, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere  $n$  aan muizen benodigd zou zijn. Daarom dat zullen in zowel subonderdeel 1, 2 als 3 mannelijke muizen worden gebruikt.

De leeftijd van de muizen voor het toedienen van de [REDACTED] is afhankelijk van de expressie van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen. Het is reeds bekend dat op een leeftijd van 24 weken, EZH2 significant is verhoogd in de glomerulaire endotheelcellen in BTBR<sup>ob/ob</sup> ten opzicht van BTBR<sup>wt/wt</sup>. De [REDACTED] zullen worden toegediend op het moment dat een verhoging van EZH2 voor het eerst optreedt in BTBR<sup>ob/ob</sup> ten opzichte van controle dieren BTBR<sup>wt/wt</sup> of op de vroegst mogelijke leeftijd dat experimenten met de dieren mogelijk

is. Dit moet echter nog worden uitgezocht in weefsels van BTBR<sup>ob/ob</sup> dieren van verschillende leeftijden. Dit zal worden gedaan in archiefmateriaal in samenwerking met een onderzoeksgroep van de ██████████. Daarom zullen de ██████ worden toegediend tussen de leeftijden 8 en 24 weken.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

Voordat wordt begonnen aan deze dierstudie is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor E-selectine tot expressie werd gebracht op het celmembraan, waarna ze zijn blootgesteld aan ██████████. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress.

Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebrafish of fruitvlieg. Verder is het gebruik van 'lagere' diersoorten niet mogelijk, aangezien de effecten van ██████ met siRNA primair in het glomerulair endotheel worden onderzocht, waarbij de primaire uitleesparameter ACR is.

#### Verfijning

Het BTBR<sup>ob/ob</sup> muismodel is het muismodel voor diabetische nefropathie dat spontaan glomerulosclerose ontwikkelt. Hierdoor hoeven de dieren niet worden geïnjecteerd met chemische middelen en ervaren hierdoor minder ongerief. Tevens ontwikkelen de muizen diabetische nefropathie in een relatief korte tijdsduur. Hierdoor kan de ██████ interventie worden getest in een korte tijdspan, wat ook minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur.

Er wordt gekozen voor een dosis waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwacht dat geen toxiciteit en ongerief wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden gedood.

Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.

Na bloedafname en injectie met ██████ onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking.

De muizen worden dagelijks gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling



en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

### **Vermindering**

Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke gedood worden op het tijdstip van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (4 weken ofwel 28 dagen).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Nadat GS spontaan is ontwikkeld, kan de muis een ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: Vermeerderde eetlust/drinken, gewichtstoename. Om aan de vergrote eetlust te voldoen, zullen de dieren eten en drinken ad libitum krijgen.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [REDACTED] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De gebruikte [REDACTED] dosis is afgeleid van subonderdelen 1 en 2 en studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde en gepubliceerde studies.

De muizen worden dagelijks gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierversorgers van de proefdierfaciliteit. Indien nodig worden dieren eerder opgeofferd dan gepland op basis van bereikte humane eindpunten.

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De niveaus van glucose worden wekelijks gemeten, om de status van de diabetes nauwkeurig in de gaten te houden.

De eetlust van de BTBR<sup>ob/ob</sup> dieren is verhoogd waardoor deze dieren meer gaan eten, gewichtstoename ondervinden en obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van. Voedsel zal ad libitum worden aangeboden, om te zorgen dat de muizen voldoende te eten hebben. De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse █████ of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de █████ of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze vakgroep, verwachten we geen nier- en levertoxiciteit van de dosis █████. Deze dosis is gevalideerd als veilig █████). Deze dosis zal dan ook in dit deelproject worden gebruikt. Het is daarom onwaarschijnlijk dat de muizen toxiciteit van de █████ zullen ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden.

De eetlust van de BTBR<sup>ob/ob</sup> dieren is verhoogd waardoor obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse █████ of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Ter verlichting van het lichte ongerief door de vermeerderde eetlust, zal voer ad libitum worden aangeboden in de kooi.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de █████ of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

De dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en gedood.

## J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, SOS injecties onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen wanneer een van de volgende omstandigheden zich aandienen:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

De muizen worden maximaal 35 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen verwacht.

In subonderdeel 2:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen verwacht.

In subonderdeel 3:

Er wordt in de groep BTBR<sup>wt/wt</sup> muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met [REDACTED] niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep BTBR<sup>ob/ob</sup> muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

## K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De mate van ongerief door de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie, glomerulosclerose is licht.

De mate van ongerief door de eenmalige [REDACTED] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [REDACTED] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.

Vier maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

De dieren in subonderdeel 1 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 20 dieren.  
De dieren in subonderdeel 2 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 24 dieren.  
De dieren in de pilot zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 50 dieren.  
De dieren in subonderdeel 3 zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 200 dieren.  
In totaal ervaren 44 dieren licht ongerief (15% van de dieren) en 250 dieren matig ongerief (85% van de dieren).

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie en GS het gevolg is van de genetische achtergrond van de muizen. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [REDACTED] en het wondje in de staart door bloedafname.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

In subonderdeel 1 zullen de muizen worden gedood 6 uur na de injectie met de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren zullen de aflevering en bio-distributie van de [REDACTED] in de verschillende experimentele groepen worden bepaald.

In subonderdeel 2 zullen de muizen worden gedood 48 uur na de injectie met de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren wordt de verlaging van EZH2 in de endotheelcellen na behandeling met de verschillende soorten [REDACTED] bepaald.

In subonderdeel 3 zullen de groepen muizen worden gedood 28 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [REDACTED] om bloed en organen te isoleren. Hierin zullen belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 2          | Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In dit project worden Thy1.1 muizen gebruikt (erkende leverancier), opgedeeld in 2 groepen: (a) met anti-Thy1.1 antilichamen behandeld voor inductie acute proteïnurie gevolgd door GS (anti-Thy1.1 muizen) (b) met niet-reactief IgG antilichamen behandeld (IgG muizen), als controle groep:

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

De anti-Thy1.1 muis staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarin zich acute proteïnurie ontwikkelt gevolgd door glomerulosclerose (GS). In de glomerulus, op de podocyten, van deze muis komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 60-80% van de glomeruli sclerose bevatten. Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan ontwikkelt en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Doordat een ontstekingsreactie gaande is in de glomeruli van Thy1.1 muizen die anti-Thy1.1 antilichamen

geïnjecteerd hebben gekregen, is het glomerulair endotheel geactiveerd/beschadigd en daardoor wordt het adhesie molecuul E-selectine tot expressie gebracht op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcel. E-selectine kan hierdoor als target worden gebruikt om de [REDACTED] ) naartoe af te leveren. [REDACTED] specifiek aan de geactiveerde/beschadigde endotheelcellen in de glomeruli worden afgeleverd. Als controle voor endotheelcel-specifieke aflevering van [REDACTED] [REDACTED]

### Subonderdeel 1

Dit onderdeel heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [REDACTED] [REDACTED] biodistributie en de eventuele nier-en levertoxiciteit in acute proteïnurie en GS te bestuderen:

In bijlage 1 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose onderzocht in het chronische BTBR<sup>ob/ob</sup> model. Deze muizen ontwikkelen glomerulosclerose door een genetische verandering. In de huidige bijlage wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose in het acute anti-Thy1.1 model onderzocht. Deze muizen worden geïnjecteerd met anti-Thy1.1 antistoffen waardoor glomerulosclerose ontstaat.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose in deze modellen door andere stimuli veroorzaakt wordt, kan de activatie van glomerulaire endotheelcellen verschillend kan zijn in beide modellen. Dit kan een andere expressie van E-selectine op het glomerulaire endotheel ten gevolge hebben, waardoor de targetting anders kan zijn. De E-selectine expressie wordt geanalyseerd in archiefmateriaal van anti-Thy1.1 muizen, alvorens het dierexperiment wordt gestart.

Naast een veranderde E-selectine expressie, kan de efficiëntie van targetting verschillend zijn in beide modellen door verstoorde bloedflow of een meer systemische activatie van het endotheel door de anti-Thy1.1 antistoffen.

Om een veranderde targetting vast te kunnen stellen is dezelfde workflow nodig in zowel bijlage 1 als bijlage 2.

Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:

Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren. De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [REDACTED]

[REDACTED] ), zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:

- Behandeling met E-selectine getargete SOS met daarin siRNA tegen EZH2 (E-sel-SOS-siEZH2)
- Behandeling met IgG-SOS-siEZH2 (niet getarget, wel siEZH2)

Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden gedood onder volledige anesthesie 6 uur na de [REDACTED] injectie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdstip wordt gekozen om de aflevering van [REDACTED] aan het glomerulair endotheel te onderzoeken, ten opzichte van de aflevering van de [REDACTED] aan het glomerulair endotheel in de controlegroep die [REDACTED] [REDACTED] ) heeft ontvangen. Deze experimentele groepen geven ons de mate van aflevering van de verschillende [REDACTED] die wordt vastgesteld in de glomeruli, maar ook in de lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta, hart en andere delen van de nier.

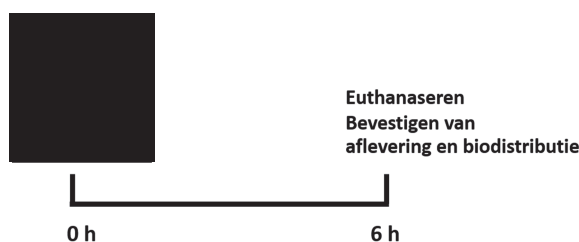
In de geïsoleerde bloed en weefsels wordt de aflevering van de [REDACTED] de bio-distributie en de eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. In de anti-Thy1.1 muizen zal de expressie van E-selectine op de glomerulaire endotheelcellen nog worden bepaald in archiefmateriaal alvorens het dierexperiment wordt uitgevoerd. In de glomeruli van dit muismodel vindt een ontstekingsreactie plaats, waardoor het zeer waarschijnlijk is dat de glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn en daardoor E-selectine tot expressie brengen op het celmembraan. [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

aan de glomerulaire endotheelcellen. De binding van het [REDACTED] antilichaam aan de glomerulaire endotheelcellen kan worden vastgesteld door de E-selectine antilichamen aan te tonen in de weefsels van de anti-Thy1.1 muizen. Deze lokalisatie van anti-E-selectine antilichamen wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel, en is eerder met succes uitgevoerd ([REDACTED]).

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



## Subonderdeel 2

Wanneer [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlagings van EZH2 door [REDACTED] worden bestudeerd:

Voor dit doel worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:

Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren.

De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [REDACTED]

[REDACTED], zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden hierbij onderverdeeld in 4 verschillende groepen:

- Behandeling met E-selectine getargete [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]

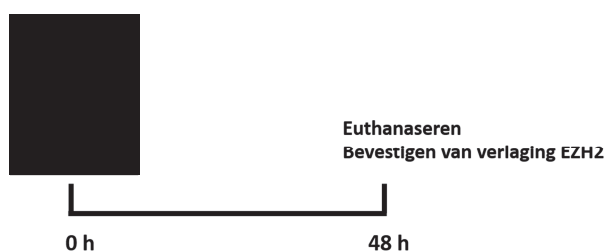
Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden gedood 48 uur na de [REDACTED] injectie onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdstip wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [REDACTED] een verlagings van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligt ten opzichte van de controlegroepen die [REDACTED]

[REDACTED] hebben ontvangen.

In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd wat de verlagings van EZH2 in endotheelcellen is na de behandeling met de verschillende soorten [REDACTED]. In de glomeruli in de nieren zal worden bepaald of de [REDACTED] verlaagt in de glomerulaire endotheelcellen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



## Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp van [REDACTED] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [REDACTED] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen gedurende 2 weken te behandelen met als doel EZH2 te verlagen in glomerulaire endotheelcellen.

Voor dit doeleinde worden zowel anti-Thy1.1 muizen als IgG muizen gebruikt. In de experimenten worden alle anti-Thy1.1 groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd). Op de leeftijd van 5 weken worden de anti-Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren, of de muizen worden onderworpen aan een injectie met niet-reactieve IgG antistoffen als controle groep. Vanaf de dag er na worden de muizen gedurende 2 weken behandeld met [REDACTED] of vehicle. Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met een niet-getargete EZH2 remmer om EZH2 te verlagen uitgevoerd nadat acute proteïnurie en GS zijn geïnduceerd. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Gedurende 2 weken, worden anti-Thy1.1 muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [REDACTED], [REDACTED]. IgG muizen zullen gedurende deze 2 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit HEPES en NaCl, pH 6,7. Dit is de buffer waarin de [REDACTED] zich bevinden. De eerste injectie van [REDACTED] of vehicle zal 1 dag na de injectie met anti-Thy1.1 of IgG antilichamen worden toegediend. Naast de [REDACTED] groepen, wordt een groep anti-Thy1.1 muizen gedurende 2 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrouwbare dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep anti-Thy1.1 muizen wordt gedurende 2 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De anti-Thy1.1 muizen worden opgedeeld in 5 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met [REDACTED]
- Behandeling met farmacologische small molecule inhibitor van EZH2
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De IgG muizen worden behandeld met vehicle.

De benodigde dosis van [REDACTED] is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze onderzoeksgroep [REDACTED]). Tevens is na deelproject 1 en subonderdeel van huidig deelproject bekend of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 bewerkstelligt, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in dit deelexperiment zal worden gehanteerd.

De betrouwbare dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 2 weken zien er als volgt uit:

**Op dag -1** worden de muizen onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 of niet-reactieve IgG antilichamen. De muizen zullen hierna gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie te kunnen vaststellen aan het begin van het experiment. Aan de hand hiervan kunnen we schade aan de glomerulus meten en vergelijken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment.

**Op dag 0**, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie



met [REDACTED] of vehicle worden gegeven. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen worden gemonitord in het bloed. De dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Iedere week, gedurende 2 weken (14 dagen), zal aan de muizen een injectie met [REDACTED] of vehicle worden toegediend (**op dag 0 en dag 7**) en zal bloed (100µl/25 gram lichaamsgewicht/7 dagen) worden afgenomen door middel van het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0.

**Op dag 6** zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen gedurende de interventie.

**Op dag 13** zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als meter voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee wordt bepaald of de [REDACTED] groep minder glomerulaire schade heeft na 2 weken van EZH2 targeting in de glomerulaire endotheelcellen, ten opzicht van de andere experimentele groepen.

**De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde anti-Thy1.1 muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [REDACTED]. Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 14 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.**

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE							
		Physical examination	Body weight	Injection anti-Thy1.1 / IgG	Injection vehicle / [REDACTED] or inhibitor/vehicle	Blood collection	Urine collection (metabolic cage 24h)	Harvest kidney + other organs	Weigh organs and fixation/freezing
TIME (days)	-1	X	X	X			X		
	0	X	X		X	X			
	1	X	X						
	2	X							
	3	X	X						
	4	X							
	5	X	X						
	6	X					X		
	7	X	X		X	X			
	8	X	X						
	9	X							
	10	X	X						
	11	X							
	12	X	X						
	13	X					X		
14	X	X			X		X	X	

Om de rol van EZH2 in glomerulair endotheel te onderzoeken, wordt 2 weken als tijds punt aangehouden, aangezien over een langere periode (2 weken) wordt onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geremd en/of gestopt. Op een vroeger tijds punt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 2 weken worden alle muizen gedood, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren wordt onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. In de lever, milt en longen wordt onderzocht of hierin veel [REDACTED] terecht zijn gekomen, aangezien in deze organen veelal [REDACTED], kunnen ophopen. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [REDACTED] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

- Albumine-creatinine ratio (uitleesparameter van nierfunctie)
- Urinair elektrolyten (als maat voor nierschade)
- Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
- Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
- Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

1. Inductie van acute proteïnurie gevolgd door GS door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antilichamen.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle, [REDACTED] gedurende 2 weken. De benodigde dosis [REDACTED] wordt bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze onderzoeksgroep [REDACTED]). Tevens zal na deelproject 1 en subonderdeel 1 van huidig deelproject bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 van huidig deelproject is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en -schade worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Muizen worden 3 keer gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Echter, de dieren worden alleen 3 keer in de metabole kooi gehuisvest wanneer de dieren vitaal genoeg zijn.

5. Doden 14 dagen na eerste intraveneuze injectie met [REDACTED] onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 14 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht in dit acuut model.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Subonderdeel 1:

In dit experiment wordt de aflevering van de [REDACTED] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [REDACTED] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd, om het aantal benodigde dieren te berekenen.

Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook [REDACTED] bevatten werden gebruikt, werd een verschil van 70% in aflevering geobserveerd tussen [REDACTED]. We stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen [REDACTED]. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is. Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 7%
- Gewenste effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen anti-Thy1.1 muizen ([REDACTED]). Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

**2 groepen x (n=10) = 20 anti-Thy1.1 muizen**

### Subonderdeel 2:

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse. In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ██████████ werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd.

We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van ██████████. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal  $n=5$  muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom  $n=6$  muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt ██████████

**4 groepen x (n=6) = 24 anti-Thy1.1 muizen.**

### Subonderdeel 3:

Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.

Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in anti-Thy1.1 muizen wordt de mate van glomerulosclerose aangehouden. Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 71% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8% wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: anti-Thy1.1 vehicle en anti-Thy1.1 ██████████

Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0,95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in glomerulosclerose: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal  $n=21$  dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uitkomt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom  $n=25$  muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 anti-Thy1.1 muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgesgaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de effecten en therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de mate van glomerulosclerose die wordt gemeten in de nier weefsels.

We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- $\alpha = 0.95$
- Power = 90%
- SD = 20%
- Gewenste effect grootte = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.

In totaal worden 1 groep IgG muizen en 7 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt = 8 groepen  
**8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 IgG muizen en 175 anti-Thy1.1 muizen).**

In totaal wordt in dit deelproject gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 2: 24 anti-Thy1.1 muizen
- Pilot: 50 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 3: 175 anti-Thy1.1 en 25 IgG muizen

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

In deze studie worden anti-Thy1.1 muizen gebruikt, welke model staan voor Focal Segmental Glomerulosclerose, waarin zich acute proteïnurie en GS ontwikkelen. In de glomerulus, op de podocyten van deze stam komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 71% van de glomeruli sclerose bevatten. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan wordt ontwikkeld en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, om de hormonale invloeden in vrouwelijke muizen op het ziekteproces te minimaliseren. In dit project zou het gebruik van vrouwelijk muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere  $n$  aan muizen benodigd zou zijn. Daarom zullen in zowel subonderdeel 1, 2 en 3 mannelijke muizen worden gebruiken.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

### Vervanging

Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor E-selectine tot expressie werd gebracht op het celmembraan, waarna ze zijn blootgesteld aan ██████████. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress. Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.

### Verfijning

Het anti-Thy1.1 muismodel staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerose, waarbij acute proteïnurie en GS optreden. Anti-Thy1.1 muizen ontwikkelen door een eenmalige injectie versnelde proteïnurie en glomerulosclerose. Hierdoor kan de ██████ interventie worden getest in een korte tijdspan, wat minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur in andere modellen.

Er wordt gekozen voor een dosis ██████████ waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwacht dat geen toxiciteit wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden gedood.

Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.

Na bloedafname en injectie met ██████ onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking.

De muizen worden dagelijks gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

### Vermindering

Voordat het experiment wordt begonnen, zal allereerst worden berekend hoeveel muizen er nodig zijn per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten van het experiment (poweranalyse). Dit aantal dieren zal worden geïncludeerd. Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke gedood worden op het tijdstip van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (2 weken ofwel 14 dagen).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Nadat GS is geïnduceerd door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, kan de muis licht ongerief ervaren. Ter verlichting van het ongerief als gevolg van bloedafname en toediening van ██████ of vehicle onder algehele anesthesie, ontvangen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De gebruikte ██████████ is afgeleid uit deelproject 1, studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde en gepubliceerde studies.

De muizen worden dagelijks gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in

samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van het CDP. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De muizen zullen dagelijks worden

gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse █████ of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole kooi te worden gehuisvest.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de █████ of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van deelproject 1 en eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze onderzoeksgroep, wordt geen nier- en levertoxiciteit van de █████ verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS en zullen hierdoor licht ongerief ondervinden.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse █████ of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de █████ of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

De dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en gedood.

## J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, █████ injecties onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

Daarnaast blijven de muizen maximaal 15 dagen in het experiment.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

De muizen worden maximaal 15 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.



In subonderdeel 2:

Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 3:

Er wordt in de groep IgG muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met ████████ niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met ████████ niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met ████████ niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met ████████ niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

## K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De mate van ongerief door de ontwikkeling van proteïnurie en GS is licht.

De mate van ongerief door de eenmalige anti-Thy1.1 en ████████ injectie is geschat als licht. De wekelijkse ████████ of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.

Drie maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

De dieren in subonderdeel 1 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 20 dieren.

De dieren in subonderdeel 2 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 24 dieren.

De dieren in de pilot zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 50 dieren.

De dieren in subonderdeel 3 zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 200 dieren.

In totaal ervaren 44 dieren licht ongerief (15% van de dieren) en 250 dieren matig ongerief (85% van de dieren).

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van proteïnurie en GS het gevolg is van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 injectie. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met ████████ en het wondje in de staart door bloedafname.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

In subonderdeel 1 zullen de muizen worden gedood 6 uur na de injectie met de verschillende condities ████████ om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren zullen de aflevering en bio-distributie van de ████████ in de verschillende experimentele groepen worden bepaald.

In subonderdeel 2 zullen de muizen worden gedood 48 uur na de injectie met de verschillende condities ████████ om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren wordt de verlagings van EZH2 in de endotheelcellen na behandeling met de verschillende soorten ████████ bepaald.

In subonderdeel 3 zullen de groepen muizen worden gedood 14 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities ████████ om bloed en organen te isoleren. Hierin zullen serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlagings van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens



GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD1050020173184  
**Bijlagen**  
1

Datum 25 september 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie" met aanvraagnummer AVD1050020173184. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd het ongerief van de dieren in meer detail te beschrijven. Voor de NTS is gevraagd de 3V's meer inhoudelijk te beschrijven. Op basis hiervan zijn de bijlagen dierproeven aangepast en heeft u een herziene NTS ingediend.

#### **Beslissing**

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

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

U kunt met uw project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 september 2017 tot en met 1 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 25 augustus 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:**

25 september 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1050020173184

**Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:**  
25 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1050020173184



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Rijksuniversiteit Groningen  
**Adres:** A. Deusinglaan 1  
**Postcode en plaats:** 9713 AV GRONINGEN  
**Deelnemersnummer:** 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 september 2017 tot en met 1 juni 2022, voor het project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie" met aanvraagnummer AVD1050020173184, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Promovendus.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 september 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 25 augustus 2017, ontvangen op 25 augustus 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 september 2017

**Aanvraagnummer:**  
AVD1050020173184

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	294	85% Matig 15% Licht	
<b>3.4.4.2 Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	294	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.

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:**  
AVD1050020173184

## 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:**  
AVD1050020173184

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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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