



Instantie voor  
Dierenwelzijn  
Utrecht

	<b>Dossier: AVD1150020173344</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	X
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	X
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	X
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	X3
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	X
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	X
	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	X2
	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	X2
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	X
<b>8</b>		
<b>9</b>		
<b>10</b>		



## 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	Creëren van nieuwe bloedvaten voor patiënten met nierfalen, doormiddel van lokale weefsel constructie
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	weefselconstructie, bloedvaten, nierfalen

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Steeds meer mensen krijgen last van nierfalen. Dit komt doordat mensen steeds ouder worden en omdat de medische zorg zo goed is geworden dat mensen langer kunnen leven ondanks medische problemen. Nierfalen is een ernstige ziekte met een grote invloed op het dagelijks leven en de levensverwachting van de patiënt. Onze nieren hebben we nodig om afvalstoffen uit ons bloed te filteren. Patiënten met ernstige nierziekte krijgen dialyse, een behandeling die deze filterfunctie van hun eigen nieren overneemt. Hiervoor moeten patiënten worden aangesloten op een dialyse machine om hun bloed te filteren. Echter kunnen de bloedvaten van patiënten met nierfalen uiteindelijk verstopt raken en is er een alternatieve aansluiting nodig. Een veelbelovende therapie is het maken van synthetische bloedvaten met behulp van weefselconstructie. Daar is
---	--

	<p>al veel onderzoek naar gedaan, maar dat onderzoek tot nu toe is gedaan bij gezonde dieren en met vaten die kleiner zijn dan uiteindelijk in de mens zouden worden toegepast. In ons onderzoek willen we daarom kijken of deze weefselconstructie bij zieke dieren in een klinisch relevant formaat ook een goede behandeling kan zijn. Dit is belangrijk om te bekijken of deze therapie uiteindelijk in zieke mensen kan worden toegepast.</p>
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Het wetenschappelijke belang van onze project is om te onderzoeken welke verschillen er zijn in wondheling bij ziekte (nierfalen) en gezondheid. Er is een toename in bewijs dat heling anders werkt bij patiënten met nierfalen, maar ook dat deze mensen aangestarte bloedvaten hebben. Wij willen graag weten wat er dan precies anders is en of dit wellicht invloed heeft op de mogelijk toepassing van synthetische bloedvaten.</p> <p>Het maatschappelijke belang daarvan is om te beoordelen of het proces van 'weefselconstructie' geschikt is voor mensen met nierfalen. Wellicht moet de therapie aangepast worden aan de patiënt. We kunnen dan zieke mensen helpen hun welbevinden te verbeteren door een verstopt of beschadigd bloedvat te vervangen. Hiermee verwachten wij uiteindelijk de zorg voor de patiënt verbeteren.</p>
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantalen zullen worden gebruikt?	<p>Voor dit onderzoek zullen wij zowel ratten als geiten gebruiken,</p> <p>Ratten: 580</p> <p>Geiten: 121</p>
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<p>De ratten ondergaan een operatie waarbij we delen van de nieren verwijderen. Bij de geiten zullen de bloedvaten naar de nier afgeklemd worden, zodat de nieren een gedeelte van hun functie verliezen.</p> <p>Om bij te kunnen houden hoe ziek de dieren zijn, zal af en toe bloed worden afgenoemd, bloeddruk worden gemeten of urine worden afgenoemd. Alle dieren zullen daarnaast, onder volledige verdoving, een synthetisch bloedvat krijgen, waarbij een stukje van hun eigen bloedvat verwijderd wordt. Omdat het belangrijk is dat de dieren goed herstellen, zullen ze tijdens de proeven nauwlettend in de gaten worden gehouden en tevens wordt er na alle operaties pijnstilling aan de dieren gegeven.</p>
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	<p>Ratten: matig ongerief</p> <p>Geiten: matig ongerief</p>
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	<p>De geiten en ratten met nierziekte zullen aan het eind van het experiment gedood worden. Het is niet ethisch om dieren met nierziekte langer dan nodig te laten leven worden, bovendien moeten wij het geconstrueerde weefsel uitnemen voor de volledigheid van het onderzoek. Daarnaast zullen we ook naar andere organen kijken, om te bestuderen wat het effect op de algemene gezondheid is.</p>

#### 4 Drie V's

<p><b>4.1 Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>	<p>Tijdens dit project maken we ook gebruik van proefdiervrije methode, zoals cel- en weefselkweek. Ook willen wij in de toekomst gebruik maken van cellen van mensen met nierfalen. Deze resultaten zullen het onderzoek met proefdieren ondersteunen. Wel is het nodig om dierproeven te gebruiken om het vormen van weefsel te kunnen bestuderen. Zo kunnen we naar de aanwezigheid van verschillende soorten cellen kijken, begrijpen hoe het herstel en afbraak van het synthetisch bloedvat verloopt en hoe de rest van het lichaam daarop reageert. In kweek kunnen we deze complexe processen niet nabootsen en dus blijven dierproeven essentieel onderdeel van het project voordat we deze vaatprothesen kunnen gaan testen bij mensen.</p>
<p><b>4.2 Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>	<p>Als eerste zullen we voor het begin van de proeven statistische berekeningen doen die ons vertellen hoeveel dieren er nodig zijn, waardoor we niet meer dieren gebruiken dan strikt noodzakelijk. Er zijn verschillende momenten in het project ingebouwd die kunnen dienen als 'stop-moment'. Op het moment dat een proef niet verloopt zoals verwacht, zal deze worden stilgezet.</p>
<p><b>4.3 Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p>	<p>De voorgestelde proeven zullen worden uitgevoerd op zowel de geit als de rat. In de onderzoeks groep is veel ervaring met operaties op proefdieren, waardoor we niet alleen het aantal dieren kunnen beperken maar ook het ongerief kunnen beperken.</p>
<p>Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.</p>	<p>We verwachten dat er matig ongerief bij de dieren kan ontstaan. Daarom zal na alle operaties pijnstilling gegeven worden aan de dieren. Vanzelfsprekend zullen de dieren tijdens de operatie voldoende verdoving krijgen en worden de operaties uitgevoerd door goedgetraind personeel.</p> <p>Het getrainde personeel zal de dieren tevens nauwlettend in de gaten houden. Wanneer dieren niet goed lijken te herstellen na een operatie, zijn er verschillende maatregelen die genomen kunnen worden, zoals aanpassen van dieet, extra pijnstilling of tijdelijk apart huisvesten. Ook zal na het plaatsen van het bloedvat regelmatig gecheckt worden hoe de doorbloeding bij de dieren is, om er zeker van te zijn dat alle weefsels voldoende zuurstof krijgen.</p> <p>Mocht een dier desondanks in conditie verslechteren dan zal het pijnloos worden gedood.</p>

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

**Andere opmerkingen**

---



## Centrale Commissie Dierproeven



# 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?

*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in | 11547

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie | UMC Utrecht

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED]

KvK-nummer | 30244197

Straat en huisnummer | Instatie voor Dierenwelzijn

Postbus | 12007

Postcode en plaats | 3501AA | Utrecht

IBAN | NL27INGB0000425267

Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

(Titel) Naam en voorletters | [REDACTED]  Dhr.  Mw.

Functie | PhD student

Afdeling | Nephrology & Hypertension

Telefoonnummer | [REDACTED]

E-mailadres | [REDACTED]

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters | [REDACTED]  Dhr.  Mw.

Functie | Post doc

Afdeling | Nephrology & Hypertension

Telefoonnummer | [REDACTED]

E-mailadres | [REDACTED]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

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?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

<p><b>2.1 Wat voor aanvraag doet u?</b></p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Nieuwe aanvraag &gt; Ga verder met vraag 3</b></p> <p><input type="checkbox"/> <b>Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn</b></p> <p style="margin-left: 20px;"><b>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2</b></p> <p><input type="checkbox"/> <b>Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn</b></p> <p style="margin-left: 20px;"><b>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3</b></p>
<p><b>2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?</b></p>	<p><input type="checkbox"/> <b>Ja &gt; Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier</b></p> <p><input type="checkbox"/> <b>Nee &gt; Ga verder met vraag 3</b></p>
<p><b>2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?</b></p>	<p><input type="checkbox"/> <b>Nee &gt; Ga verder met vraag 3</b></p> <p><input type="checkbox"/> <b>Ja &gt; Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6</b></p>

### 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 1 - 10 - 2017
3.2	Wat is de titel van het project?	In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Weefselconstrucie van bloedvaten voor patienten met nierfalen
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doogaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC DEC Utrecht Postadres Postbus 85500, 508 GA Utrecht E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € € 1.287,-      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  
Functie  
Plaats  
Datum  
Handtekening

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	[Redacted]
Datum	26-02-2017
Handtekening	[Redacted]



## Form

### Project proposal

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

## 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11547
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. UMC Utrecht
- 1.3 Provide the title of the project. In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts

## 2 Categories

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

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

### Problem

In the Netherlands 4600 patients require hemodialysis to treat end stage renal disease. Vascular access is considered the Achilles' heel of hemodialysis. The leading cause of failure is occlusion of the graft by thrombosis (80%), in which venous neo-intimal hyperplasia (NIH), excessive cell proliferation of the

vascular wall, is the underlying pathology in 90% of the cases. The median patency of current vascular access options is only 7-15 months, requiring frequent interventions.

### **Current vascular access grafts**

The currently used vascular grafts are made of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE). ePTFE is a biocompatible material with a low-fouling and high strength-to-weight ratio, giving it the concept of an ideal vascular access graft. Unfortunately, the ePTFE grafts are associated with high incidence of occlusion by thrombosis and infection, resulting dialysis graft failure. This is thought to be linked to the lack of self-healing properties of the material in combination with the lasting damage caused by repeated puncture. Repeated needle punctures of ePTFE grafts, although necessary for hemodialysis, pose a continuing threat to the long-term integrity of the conduit wall. Thrombi rapidly fill the track left by needle punctures and fibrous ingrowths then fill the remaining hole and fuse with the fibrous capsule surrounding the graft. Accumulation of these clots at frequently used sites of graft punctures creates uneven and relatively thrombogenic flow surface. With regenerative fibrosis at these sites, luminal narrowing may occur, leading to flow-limiting stenosis and graft thrombosis. Besides the increased risk of stenosis, the repetitive puncture in combination with the lack of self-healing properties is instrumental in the considerable risk of ePTFE graft infection due to the increased difficulty of puncture, perigraft hematoma formation and prolonged postdialysis bleeding from the graft. Once infected, the PTFE graft (due to its synthetic nature), may in turn act as a source of bacteremia when the original source of infection had been eliminated and forgotten. So therefore there is need for an improved way to create a vascular access graft. To validate and prove our vascular graft we plan to compare its functionality to the current golden standard ePTFE grafts.

### **The proposed solution**

Based on our previous preclinical and clinical results, we propose a radically different approach. We aspire, by means of *In situ* tissue engineering (*In situ* TE), to develop off-the-shelf available, biodegradable, synthetic, porous bilayered AV-grafts that *in vivo* gradually transform into living, vascular access grafts with improved long-term functionality. These grafts are designed to minimize thrombosis and intragraft neo-intimal hyperplasia. For this purpose, we will apply a biodegradable supramolecular elastomeric materials (STE) platform developed by our collaborators. These materials have been successfully used to create TE heart valves<sup>1</sup> and we will process them into vascular graft scaffolds using electrospinning. To minimize thrombogenicity and intragraft neo-intimal hyperplasia, the lumen layer will be functionalized to be either non-cell adhesive or selective cell-adhesive to specifically capture tissue specific cells.

### ***In vivo* validation of efficacy and safety**

A very important next step towards application of the novel vascular access grafts in patients is the *in vivo* testing in animal models. Prior to the *in vivo* experiments, extensive *in vitro* testing of the electro spun grafts has been (or will be) performed to validate mechanical and functional safety before implantation, which includes (1) burst strength, (2) suture retention, (3) degradation and (4) hemocompatibility tests. However, the *in vitro* situation profoundly differs from that *in vivo*. So (only) in case of a positive *in vitro* safety and efficacy assessment we will proceed to *in vivo* (animal) testing. But for proper evaluation of *in vivo* performance, efficacy and safety, *in vivo* testing will be inevitable. Verification of performance, efficacy and safety in animal trials is required to allow approval for use in clinical trials and is also a prerequisite for CE certification and, finally, market entry of novel vascular access grafts. Eventually the decision to continue exploring the novel techniques in a clinical trial will be taken after completion of the *in vivo* testing. The carotid AV-grafts implantation procedures we are planning to use have shown to be successfully in goats as published by Lemson et al.

In our project we are working closely with a clinical-stage company developing medical devices. They have extensive experience in implanting these materials for the use as a heart valve, therefore they will be closely involved in the process. The project plan for the *in vivo* testing is discussed with them and the findings will be documented in an investigational medical device dossier (IMDD). We will assess, at intervals, the progress of the testing. In addition, an independent medical ethics committee (METC) will evaluate whether further testing in a clinical trial is justified taking into account the *in vivo* results.

### **Influence of Disease**

During this project we will investigate whether or not uremic conditions influence the outcome (e.g. cellularization, patency) after *in situ* TE. The principles of *in situ* TE are based upon the assumption of functional progenitor cells and an immune system that has sufficient capacity to mobilize these cells to sites of injury to initiate regeneration and/or healing. It is therefore important to investigate whether or not the healing process after *in situ* TE is compromised in chronic kidney disease (CKD) due to the presence of immunological and vascular risk factors as well as stem/progenitor cell dysfunction. This will be assessed in subtotaly (5/6) nephrectomized rats and a uremic goat model.

The 5/6 Nephrectomy will be achieved by one surgical procedure: removal of the left kidney and by dissection of the poles of the right kidney, equaling ~2/3 of the weight of the previously removed right kidney<sup>3</sup>. After successfully assessing these differences in our uremic rat model we also wish to we hope to further investigate this in a large animal model (with the option of dialysis) by the utilization of an uremic goat model that is currently under development in our group.

### 3.2 Purpose

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

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

The ultimate goal is to develop an off-the-shelf available, biodegradable, synthetic, porous, AV-graft that *in vivo* gradually transform into living, self-healing vascular access grafts with improved long-term functionality, suitable for in the end a clinical application.

Herein, our **first aim** is to evaluate performance, efficacy and safety of the novel eletrospun supramolecular thermoplastic elastomers(STE) and to gather information on the behavior of our grafts in an *in vivo* environment that approximates the human situation.

From this first part, we will gain knowledge on the behavior of our material in an *in vivo* environment and will provide essential information for our design and possible functionalization of our graft further along in the project.

One of the hypothesis of this project is that alterations to the vascular and immune system due to CKD influence tissue formation after *in situ* TE. Therefore, our **second aim** is to investigate the influence of the disease CKD on early tissue outcome after scaffold implantation. Since the presence of uremic toxins and metabolic and fluid balance differ profoundly in uremic animals as compared to healthy animals, a chronic kidney failure ('uremic') model will be used. We will make use of validated protocols and expertise, thus improving feasibility of the project and decreasing mortality of animals. Moreover, *in vitro* work will performed in parallel and will support and complement *in vivo* experiments. A well-established model of CKD, the 5/6th nephrectomy, will be used in the rat. We have a long-standing track-record in performing this surgical procedure in rodents. After successfully assessing these differences in our uremic rat model we plan to further investigate this in a large animal model (with the option of dialysis) by the utilization of an uremic goat model that is currently under development in our group.

From this second part, we will gain knowledge on how on a mechanistic and molecular level, CKD influences the outcome after *in situ* TE, validated both *in vitro* and *in vivo*. This will strengthen the translation of *in situ* TE to the clinic for patients with CKD.

Our **third aim** is to determine the process of tissue formation over time and investigate the influences of functionalization (e.g. boost factors attracting stem cells or accelerating healing, non-cell adhesive layers or structural modifications) of scaffolds *in vivo*.<sup>1+unpublished results</sup> For now based on promising previous results in our group, Stromal-derived factor 1 (SDF-1) is the first candidate to be tested as a bio-functional component. But more are being researched *in vitro* to be added to this list. To achieve our goal, bio-functionalized scaffolds will be implanted both in the rat and goat (uremic and healthy) to examine the effect on cellular infiltration in both renal disease and healthy situations.

From this third part, we will gain knowledge on how on a mechanistic and molecular level, bio-functionalization influences the outcome after *in situ* TE, validated both *in vitro* and *in vivo*. This will strengthen the translation of bio-functionalized *in situ* TE to the clinic.

Another important element is the repeated puncturing of the graft to gain vascular access to enable hemodialysis. This recurring damage is a major confounder of the limited patency that coincide with transplanted vascular grafts. Accordingly, our fourth aim is to investigate the effect of repeated puncture on the process of *in situ* TE and the patency of the implanted grafts. Prior to implantation the grafts will undergo extensive *in vitro* testing and needed adjustments will be made accordingly. For this we would like to use the goat model, because of the easy access of the vasculature in the neck.

From this final part, we will gain knowledge on the effect of repeated puncture on the patency rates of our grafts and information to accommodate our designs to the prospective treatment in the clinic.

### 3.3 Relevance

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

#### Societal importance

*In situ* TE will bring new alternatives to the clinic for multiple patient populations in need of vascular replacements. Replacement of blood vessels, for instance in patients with end stage renal disease which are dependent on vascular access for hemodialysis dialysis, would be a relevant new therapy. See: 3.1

#### Scientific importance

To efficiently drive *in situ* tissue engineering, we need a profound knowledge of the different processes and their influence over time involved. By assessing different time points after transplantation we will be able to map the tissue formation process and accommodate our scaffold design to optimize the tissue formation and degradation to fit our clinical need.

Previous *in vitro* and *in vivo* studies have focused on cellularisation of scaffolds, but all in the context of functionally healthy immune and vascular systems. There is accumulating evidence that specifically CKD results in a compromised immune system, alterations to the vascular system and dysfunction of (circulating) stem cells, among others due to the high circulating levels of toxins normally cleared by the kidney. Therefore, harnessing stem cells for *in situ* TE may not be function similarly in CKD compared to healthy situations. The healing process may also differ due to functional problems with the immune system. This may result in a different functional outcome for the tissue. Bio-functionalization of a scaffold, based on attracting cells and inducing healing in healthy circumstances, may also have an altered outcome due to a CKD milieu. By investigating the effect of CKD in different animals, we believe we can investigate the influence of this underlying pathology and its effect on the immune and vascular system and stem cell function when applying *in situ* TE. Concluding, we believe that there is an association between the outcome of *in situ* TE and the presence of CKD. Since a high percentage of the patients in need of a tissue engineered graft, will suffer from non-conventional risk factors due to CKD, this project is highly relevant to elucidate mechanisms of *in situ* TE in rodents with CKD and uremic goats. Ultimately this will accelerate the introduction of *in situ* TE approach in the clinic.

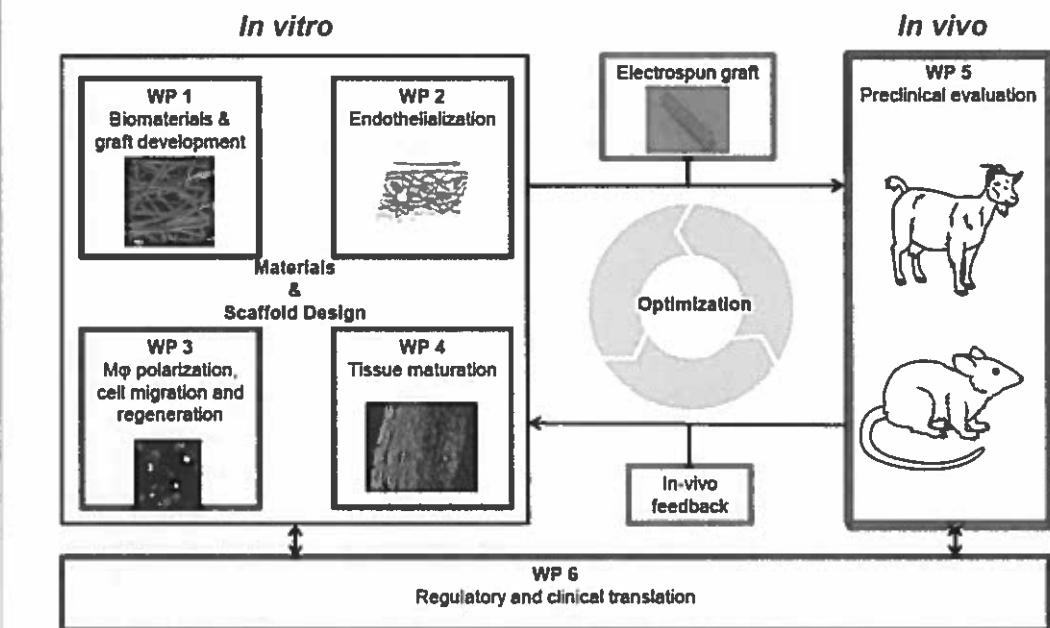
### 3.4 Research strategy

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

Prior to the *in vivo* experiments, extensive *in vitro* testing has been (or will be) performed to validate efficacy and safety of the graft *in vitro*, to develop our eventual graft that is suitable for implantation. These tests include 1) suture retentions tests, 2) burst strength tests 3) *in vitro* hemocompatibility testing, 4) *in vitro* cytotoxicity testing and 5) analysis of degradation products and leachable. For these tests we will work closely with our collaborators to design a graft to meet the quality standards for medical devices necessary for approval of its use in the clinical trials. Only in case of a positive *in vitro* safety and efficacy assessment we will proceed to *in vivo* (animal) testing (fig 1- WP5)

A basic one layered electrospun graft will be implanted in the goat model in parallel with the golden standard (ePTFE) to evaluate the behavior and patency rates. In addition to assess the influence of chronic kidney disease (CKD) on the *in vivo* tissue formation and graft patency we will use the rat 5/6th nephrectomy model, resembling several aspects of human CKD. This information will be used as feedback for the work packages for optimization of the design.

Based on these results and from WP1-4(*in vitro* work), the vascular graft design will be optimized and tested (patency, tissue formation) in a rat aortic interposition model (WP5). The best candidate will be evaluated in the goat model (uremic or healthy) up to 6-month follow-up (WP5). WP1-5 will accumulate into a regulatory and clinical translation (WP6), possibly leading to first-in-man clinical trials.



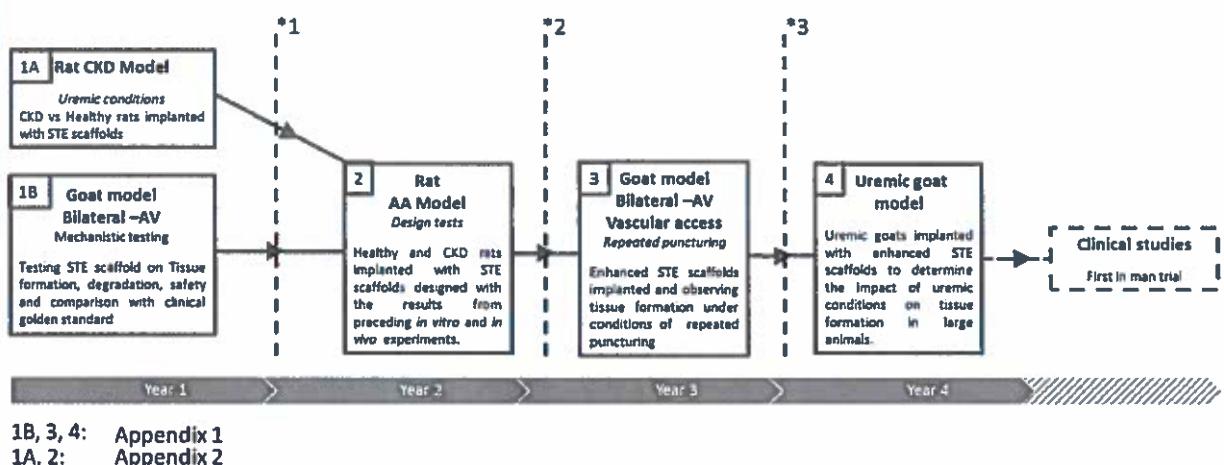
**Figure 1** – Schematic overview of InSiTeVX project in relation to each other. WP1 t/m WP4 (*In vitro*) will primarily focus on the development and *in vitro* testing. WP5 will comprise of the *in vivo* studies and will in combination with the other work packages work to develop a graft suitable for clinical purposes. WP6 is handled by a collaborating medical devices company.

### 3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

In previous studies, conducted by our research partners, similar grafts have been tested *in vivo* in healthy rat models. However, these were all small diameter grafts placed as an aortic interposition model. This model was sufficient for researching the fundamental questions about the material, but now we want to progress into preclinical studies towards a clinical application in patients. This requires that we test our grafts in clinical relevant sizes (4–6 mm diameters) in combination with hemodynamics closer to our clinical application in humans. Therefor we will use a healthy goat model, in which we implant the graft between the common carotid artery and the jugular vein (Figure 2 - 1A). The model resembles the conditions in which a vascular access graft will be implanted in patients reliant on hemodialysis. Furthermore, the cardiovascular physiology and thrombogenicity mechanisms in goats are similar to humans and are suitable for testing clinically relevant graft sizes (4–6 mm diameters). Their natural long neck allows easy implantation and monitoring through imaging techniques, such as ultrasound or CT. In addition, the endothelialization mechanisms are similar to humans, making them a suitable model for researching vascular tissue remodeling for clinical applications. The implanted grafts are either made of ePTFE (clinical golden standard), bare scaffold STE or/and a functionalized STE (likely SDF1a, due to previous experience and results). Due to the comparison of our STE graft to the currently used ePTFE, we will gain essential knowledge on the clinical advantages and challenges of our approach.

In parallel we want to investigate the possible effects of CKD on the tissue formation necessary for a successful *in situ* TE approach. This is essential, because eventually we are going to implant these grafts in uremic patients. Considering the fact that patients with CKD suffer from chronic inflammation, reduced wound healing and other defects that can directly or indirectly influence the process of *in situ* TE, we need to make sure that our final graft design is accommodated to these conditions. For this we will use a rat CKD model (5/6<sup>th</sup> nephrectomy) which has been developed in our lab (Fig. 2 - 2A). The graft will be implanted as an interposition in the abdominal aorta of the rat (figure 3). To accurately investigate the

tissue formation over time and the different processes involved, animals will be terminated at different time points for up to 5 months. This way, we are able to investigate how CKD influences scaffold degradation and tissue formation *in vivo* and whether or not we have to modulate our design to accelerate healing and tissue formation in CKD. In the CKD versus healthy rat we will perform multiple *in vivo* terminal measurements before explanting the scaffold. We will measure flow in CKD versus healthy animals as a measurement of graft patency and functionality followed by post explantation experiments consists of immunohistochemistry, qPCR and Western Blot to cell and ECM composition. This information will help us in developing a clinical applicable graft, with an augmented design adjusted to the conditions of CKD. If the possible effects of CKD prevent the formation of a functional graft *in situ* completely, we consider this as a no go and will, together with our collaborators, investigate new ways *in vitro*(fig 2 - \*).



**Figure 2 – Schematic overview of the different animal experiments in relation over time. (1A)** testing of graft under uremic conditions; **(1B)** testing clinical relevant mechanics and diameters; **(2)** testing added functionalization; **(3)** repeated puncture tolerance of most promising design; **(4)** final design under uremic conditions; leading to a first in man trial.

#### No go decision moments:

\*1= No functional *in situ* TE in AV position/CKD conditions

\*2= No gain in patency/remodeling/cell infiltration

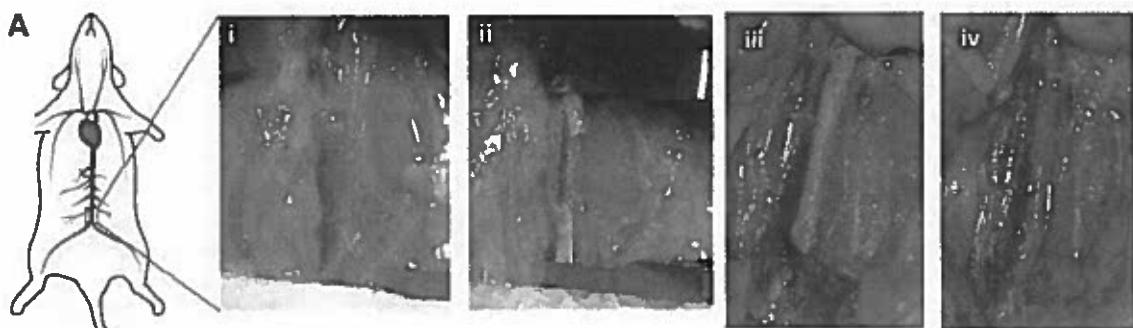
\*3= No tolerance for repeated puncturing

The combined outcome from these two parallel experiment will give the information we need to design a graft that is functional in its destined clinical setting (4-6 mm, AV-Graft, uremic conditions). For this, we work closely with our research collaborators who are working on the *in vitro* side of this project (figure 1 – wp1-4). Together we will use the information to create new designs that maximize the functionality of the grafts for clinical application under uremic conditions. These new graft designs will allow us to proceed to the more complicated phase of the study, which makes use of functionalized graft materials. But before we can make a well-informed decision, we need to know where the challenges lie and which scaffold adjustment we need to make and which processes we need to influence to create a clinical applicable vascular graft. So due to the fact that we begin by using *in vivo* data for making design choices, we prevent designing a graft that works well *in vitro*, but is not applicable/relevant *in vivo*.

For these possible designs we can vary in different mechanical properties (pore size, stiffness, and degradability) to drive different tissue formation processes needed in forming a functional vessel. Or incorporating a non-adhesive layer which can counter possible NIH, thrombosis or other unwanted interactions. Alternatively, we can incorporate a scaffold layer that will have specific cell attraction properties to increase tissue formation. Due to nature of STE in combination with the process of electro spinning, the final design can even consist of combination of these specific layers, to maximize the effect on tissue formation and counter unwanted effects. Furthermore, with the STE material that we are using

it is possible to incorporate these functionalities on a molecular level, making it an integral part of the graft, without the chance of losing functionality over time as with for example a coating.

These designs will be thoroughly tested *in vitro* before we proceed to the *in vivo* studies in the rat abdominal aorta interposition model (figure 3). Due to the fact that the rat models allow for a larger sample size, multiple promising design can be tested under *in vivo* conditions. At the end of this step we hope to have found our most promising candidate for testing under clinical conditions. If we don't succeed in replicating the positive effects from our *in vitro* experiments we consider this as no go(figure 2 - \*2) and will, together with our collaborators, investigate new ways *in vitro*.



**Figure 2 – Abdominal aortic interposition model.** A: Graft is transplanted distal of the renal artery and proximal of the aortic bifurcation. The procedure consist of four steps *i*: separating the aorta from the vena cava and surrounding tissue. *ii*: placing vascular clamps and cutting the aorta *iii*: suturing the vascular graft *iv*: releasing distal clamp for back flow, followed by the proximal clamp and patency check.

With our most promising design from step 2 we want to test further under clinical conditions. One adverse aspect that a graft must withstand in the clinic is the repeated puncture of the graft to gain vascular access enabling hemodialysis. This recurring damage is a major cofounder of the limited patency that coincide with transplanted vascular grafts. Therefore, we like to investigate the effect of repeated puncture on the process of *in situ* TE and the patency of the implanted grafts (3). To study the effects of repeated puncture on *in situ* TE, arteriovenous grafts are created on respectively the left and right sides of the neck between the common carotid artery and the jugular vein in goats. These grafts will be implanted close to surface in a dermal fold. This way the graft is easy accessible for repeated puncture and imaging. One graft will be used for repeated vascular access and the other graft will be left to mature without the repeated damage to detect the possible adverse effect on *in situ* TE due to the inflicted damage. The graft will be implanted with a maximum follow up of 6 months, wherein the grafts will be monitored by imaging to determine patency and tissue formation. After this follow up, we will measure difference in flow and loss of pressure in both grafts as a measurement of graft patency and functionality. The graft is imaged for a last time and excised together with a section of the adjoining jugular vein and carotid artery. Post explant experiments will determine the difference in tissue formation, scaffold degradation, ECM component, cell infiltration, fibrosis, stenosis, gene expression and additional relevant factors concerning *in situ* TE. This will allow us to determine the influence of repeated puncture on *in situ* TE vascular access grafts and adapt our graft design for use in the clinic. If we find that our graft design cannot withstand the repeated puncturing or does not portray a functional tissue remodeling we consider this a no go(figure 2 - \*3).

After the evaluation and optimization of performance in healthy animals under the stress of repeated puncturing (3), the grafts need to be tested under uremic conditions, these conditions will consist of a second kidney disease model closer to the human physiological conditions, namely an uremic goat model (4). The added benefit of using goats in comparison to rats, is that the cardiovascular physiology and thrombogenicity mechanisms are similar to humans and that they are suitable for testing clinically relevant graft sizes (4-6 mm diameters). This increase in size also enables us to make an arteriovenous connection, instead of the aortic interposition model in the rat. Additionally, goats have a high incidence of NIH, making them an ideal model to test our graft that aim to counter NIH formation. Currently this uremic goat model is being developed in another running project of our group. For the creation of uremic animals, they make use of bilateral subtotal renal embolization to create the remnant kidney model. Embolization is minimally invasive (does not require an open surgical procedure) and is therefore expected to result in a shorter

recovery time, less morbidity and less post procedure complications than surgical nephrectomy. If not successful, e.g. due to animal discomfort or unsuccessful embolization, they will move over to surgical nephrectomy. For our project the use of the uremic goat model is planned in the latest stage, which enables us to anticipate on the outcome of their project. After induction of chronic kidney failure, clinical condition will be closely monitored daily, including animal comfort, hydration status and body weight. Urea, creatinine and potassium concentrations will be measured on alternate days. Depending on the results we will adjust the embolization (or surgical) procedure accordingly. When we have generated enough uremic goats we will implant our optimized grafts to study the patency and tissue formation as previously was done in the healthy subjects. If the health deteriorates due to the uremic conditions, we will have the final option to put the goats on dialyses. If dialyses is not effective enough, the grafts will be explanted and the animal will be euthanized.

The combination of these experiments will hopefully grant us enough knowledge into the *in vivo* remodeling of our graft, the effect of CKD and repeated puncture to achieve our goal to develop a clinical relevant, off-the-shelf available, biodegradable, synthetic, porous, AV-graft that *in vivo* gradually transform into living, self-healing vascular access grafts with improved long-term functionality.

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

In our two first parallel studies in the rat (fig 2 - **1A**) and goat (**1B**) we tackle our two fundamental questions. Firstly how does our graft function under uremic conditions and secondly how does our graft function in a relevant diameter under clinical relevant hemodynamic conditions. These both questions need to be answered to conduct a targeted design approach to create a functional vascular access graft for uremic patients on hemodialysis. Using both a rat and goat models in a particular workflow order, will allow us to first gain essential knowledge of the *in vivo* behavior of the material in the goat model, and the effect of CKD model in rats, before making our further design choices based on the outcomes of both *in vivo* models and our *in vitro* work.

The CKD rat experiments will provide us with results on how CKD influences healing and tissue formation. Besides functionality of the graft (e.g. pressure and flow) in CKD versus healthy rats, we will be able to study differences in cell composition within the graft. Together this will help us in understanding the influence of immunological and vascular changes in CKD on *in situ* TE.

Therefore the knowledge gained in these two steps combined with the *in vitro* work of our collaborators will help us in designing a functional graft that will perform under uremic conditions. Adding bio functionalization to the scaffold will provide us with results on the mechanisms by which healing and tissue formation take place in CKD versus healthy rats. In parallel, *in vitro* results can be generated to support and complement our *in vivo* work. This improved design will be tested again in the rat model(**2**), which allows for a larger sample size which gives us the opportunity to test several designs in parallel and extensively investigate the molecular mechanisms affecting vascular graft implantation, remodeling and cell infiltration studies.

With our most promising design from step 2 we want to test further under clinical conditions. One adverse aspect that a graft must withstand in the clinic is the repeated puncture of the graft to gain vascular access enabling hemodialysis. This recurring damage is a major cofounder of the limited patency that coincide with transplanted vascular grafts. Therefore, we like to investigate the effect of repeated puncture on the process of *in situ* TE and the patency of the implanted grafts (**3**). These repeated puncture experiments will be preceded by extensive *in vitro* work to ensure the safety of the graft and we find that our graft design cannot withstand the repeated puncturing or does not portray a functional tissue remodeling *in vivo* we consider this a no go(**figure 2 - \*3**).

When we are satisfied with the mechanistic performance of the graft (patency, hemodynamics, repeated puncturing) we continue to the final testing under uremic conditions with the use of our uremic goat model, which will mimic the prospective clinical uremic situation in future patients.

During this project, the experiments in Appendix 1, Appendix 2 and Appendix 3 will be performed over the course of 4-5 years. The order of experiments (in steps) as described in the appendices will be crucial and maintained during our project; an overview is given in the figure 2.

#### 3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	<i>In vivo</i> testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in a large animal model
2	Designing an optimal <i>in situ</i> tissue engineered vascular grafts in the rat
3	<i>In vivo</i> testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in an uremic large animal model
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11547				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht				
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Serial number</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: left; padding: 2px;">1</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;"><i>In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in an large animal model</i></td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	<i>In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in an large animal model</i>
Serial number	Type of animal procedure				
1	<i>In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in an large animal model</i>				
<hr/>					

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The overall goal of these experiments is to test the *in situ TE* capacities of our designed grafts to deal with clinical conditions. Because these grafts are implanted in uremic patients, the environment in which the *in situ TE* process is conducted is substantially different from healthy wound healing conditions. Besides these grafts need to cope with the repeated needle puncturing that coincides with the hemodialysis treatment.

Firstly (1B), we want to gain knowledge on the behavior of our graft under *in vivo* conditions, the possibilities of (bio)functionalization and to assure the patency and safety. To investigate the clinical relevance we want to compare our electron spun grafts with the current golden standard made of ePTFE *in vivo*. ePTFE and supramolecular thermoplastic elastomere(STE) arteriovenous grafts are created on respectively the left and right sides of the neck between the common carotid artery and the jugular vein. Through a longitudinal incision the common carotid artery and the jugular vein are dissected. A graft 15 cm in length and with an internal diameter of 6 mm, will be tunneled in a subcutaneous loop (or in case of sham; vessels will be only clamped). In the neck goats, the arterial diameter resembles that of human elbow vessels, being 3–5 mm. The venous diameter is slightly larger and varies between 5 and 9 mm, compared with 4–8 mm in human elbow veins. This similarity in vessel diameter implies similarity in hemodynamic properties of the graft fistulas created in humans and in the neck of goats. Furthermore, Lemson et al., shows that goats are able to develop intimal hyperplasia after the creation on an av-graft, making them a suitable model to investigate the influence of our graft design on the formation of NIH<sup>1</sup>. Because of the gradual aspect of *in situ TE* we want to study the tissue formation for up to 6 months,

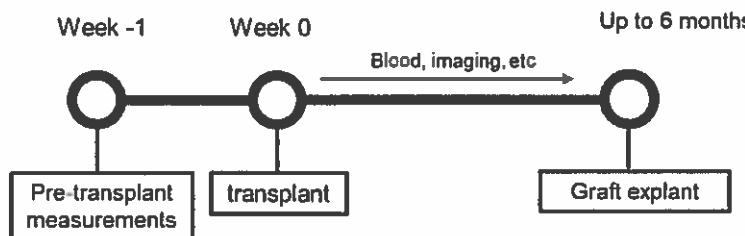
wherein we will image on set time point to monitor the formation of tissue and occlusion. This way we can realize multiple measurements and monitor the health of the goat. After 6 months the animals will be terminated and the vascular construct, with part of concreting veins and artery, will be harvested and processed for further research on the formed tissue following our cutting scheme.

Secondly (3), one of the clinical conditions our graft has to cope with is the recurrent cannulation of the graft to perform hemodialysis. This is a possible source of increased stress on the process of *in situ* TE and can possibly lead to reduced tissue formation and an increased degradation rate of the graft. Besides of our planned *in vitro* studies on these effects we think it is important to look at the outcomes *in vivo*. For these studies will we use our improved design (created with the knowledge from previous *in vivo* and *in vitro* studies) and will be similarly implanted as mentioned for the experiment under 1A. But for easy access to the vessel we want to implant the vessel closer to the surface in a skin fold in the neck. Tissue formation, graft degradation and occlusion will be monitored by frequent imaging. After up to 6 months the animals will be terminated and the vascular construct, with part of concreting veins and artery, will be harvested and processed for further research on the formed tissue following our cutting scheme.

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

#### 1B: Goat AV model

One week before implantation base measurements are taken. At week 0, arteriovenous grafts of ePTFE and supramolecular thermoplastic elastomere(STE) are created on respectively the left and right sides of the neck between the common carotid artery and the jugular vein. Through a longitudinal incision the common carotid artery and the jugular vein are dissected. A graft 15 cm in length and with an internal diameter of 6 mm, will be tunneled in a subcutaneous loop (or in case of sham; vessels will be only clamped). The loop curvature will be made to resemble the clinical implantation of a graft in the arm of a patient. Because of the gradual aspect of *in situ* TE we want to study the tissue formation for up to 6 months, wherein we will image on set time point to monitor the formation of tissue and occlusion. This way we can realize multiple measurements and monitor the health of the goat. After 6 months the animals will be terminated and the vascular construct, with part of concreting veins and artery, will be harvested and processed for further research on the formed tissue following our cutting scheme.



**Figure 1 – Experimental set-up goat implantation studies.** One week before implantation a base line measurement are performed. A week later the graft is implanted. After implantation blood will be taking periodically and the graft will be monitored by imaging for up to 6 months, when the graft is explanted.

#### 3: Repeated puncture vascular access

For these studies will we use our improved design (created with the knowledge from previous *in vivo* and *in vitro* studies). A graft 15 cm in length and with an internal diameter of 6 mm, will be tunneled in a subcutaneous loop (or in case of sham; vessels will be only clamped). But to ensure easy access to the vessel needed for repeated puncturing, we want to implant the vessel closer to the surface in a skin fold in the neck. We expect that this will not change the curvature, flow or placement of anastomoses, because it is only a small difference in depth. It will however lead to the necessity of solitaire housing, due to the increased risk of damage by physical contact that comes with the graft lying closer to the surface.

Tissue formation, graft degradation and occlusion will be monitored by frequent imaging. After up to 6 months the animals will be terminated and the vascular construct, with part of concreting veins and artery, will be harvested and processed for further research on the formed tissue following our cutting scheme.

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

#### **1B Goat AV model**

To limit the number of animals needed for the project bilateral implantation so animals can be used in multiple cohorts. One group will be implanted in one animal, e.g. left will be a sham and right an supramolecular thermoplastic elastomer (STE) graft to keep the biological variations and numbers of animals to a minimum. Our planned set-up for our first study is to investigate our STE graft under *in vivo* conditions, the possibilities of bio functionalization and to assure the patency and safety. To investigate the clinical relevance we want to compare our electron spun grafts with the current golden standard made of ePTFE. For group one we are primarily looking for systemic influences of the material. For group two (STE vs ePTFE) patency is our primary outcome and for the final group the effect of functionalization.

So our groups will be the following

- 1: Sham vs. STE
- 2: STE vs. ePTFE
- 3: STE vs. functionalized STE

We expect a total survival rate around 70% (maximum 5% technical failure scaffold implantation +25% nonfunctional blood flow through scaffold, see also Humane End Points).

Due to the fact that these materials have never been tested *in vivo* in a goat model, we take the effect we found in previous shows previous studies in rats with functionalized SDF1a scaffolds. For the outcome parameter of cellularization, the SDF1a functionalized shows a 75% increase in cellularization in comparison with a bare graft. With an effect size = 2.79, Power = 0.8 and alpha = 0.05 c, we calculated the amount of animals necessary using F-test for ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way, corrected for the number of experimental groups. The outcome was n = 14. Correcting for survivability  $1.3 \times 14 = 18.2 = 19$  animals. Keeping in mind the fact that we do a bilateral implantation we estimate that in reality we need fewer animals to reach significance. So the minimum needed animals for this group is 10 with bilateral implantation. If we use this number, we will in total perform 10 sham surgeries, implant 30 STE grafts, 10 ePTFE implants and 10 functionalized STE grafts. This will give us sufficient power to determine the patency and safety of our grafts while in the meantime make the comparison with ePTFE and the functionalized grafts. If we assume a worst case scenario that failing of one graft causing humane end points to be reached (see human end points), we need the original calculated number of 19 per group. Because we have 3 groups we need a maximum 57 animals to complete step 1a.

#### **3 Repeated puncture vascular access**

Since these implantation experiments under clinical conditions have previously never been performed. We will use 6-12 goats per study (3-6 per group), which will allow for the detection of a decrease or increase of the outcome parameters of 30% (to reach clinical significance) when the estimated relative standard deviation is 25-30% and the alpha level is 0.05 at 80% power. We believe that the variation in reality might even be lower, due to the in animal controls (one side puncturing, other side normal implantation). So we need a maximum of 12 goats to complete the repeated puncture study. When we correct this for our calculation of reaching the end of the experiment (maximum 5% technical failure scaffold implantation + 25% nonfunctional blood flow through scaffold)  $1.3 \times 12 = 15.6 = 16$  animals

#### **B. The animals**

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

We will use adult Dutch white female goats, because these animals are docile (can be easily trained), have a long neck with accessible veins and have body weights (50-100 kg) and distribution volumes that are comparable to humans. In the neck, the arterial diameter of the goat resembles that of human elbow vessels, being 3-5 mm. The venous diameter is slightly larger and varies between 5 and 9 mm, compared with 4-8 mm in human elbow veins. This similarity in vessel diameter implies similarity in hemodynamic properties of the graft fistulas created in humans and in the neck of goats. We will not use male goats, because they are less docile (difficult to train) and more difficult to house in a group (with consequences for the level of discomfort). Additionally, females will not go into estrous in the absence of male goats, adding male goats will add the complication of a hormonal cycle in the females. Furthermore, the behavior

of male goats can lead to increased physical contact and can be potentially dangerous in combination with a graft implant. The goats will be purchased from a commercial farm.

When we add the number for the different experiments; 57(1B) + 16(3) = 73

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

##### Replacement:

Prior to the *in vivo* experiments, extensive *in vitro* testing of the graft have been (or will be) performed to validate efficacy, biocompatibility and mechanical strength of the grafts *in vitro*. However, the *in vitro* situation profoundly differs from that *in vivo*; for proper evaluation of *in vivo* kinetics and influence on tissue formation, wound healing, NIH and hemodynamic implantation *in vivo* testing will be inevitable, including implantations in a large animal uremic model.

##### Reduction:

Because we implant the grafts bilateral we will need fewer animals. This ensures that individual are part of multiple cohorts, limiting the amount of animals needed. Also due to less inter-individual variability we hope to achieve statistical significance with fewer animals. To limit the number of animals required for the *in vivo* efficacy validation, we will, in first instance, use healthy animals. Additionally, to rule out any systemic effects of our graft material we make use of sham animals, that will only get a one sided implantation.

We will use the outcomes of our first experiments in goats to further design and test different designs and functionalities *in vitro* and with the use of the rat model described in appendix 2. This way we can fine tune our design and take into account the influence of CKD on the tissue remodeling and degradation. Due to this intermediate validation we will can already take informed choices before going to pre-clinical phase in the goat, thus limiting the amount of goats needed.

##### Refinement:

We will provide cage enrichment with a brush and a step/ stair. The animals will be trained for standing in a box, wearing a harness and cooperating with blood sampling during the experiment so that the situation is familiar to them. The day before the experiment the goats will receive metacam IM for analgesia and reduction of inflammation.

The day before, the day of and two days after the implantation and/or nephrectomy the animals will receive NSAIDs and/or opiates for analgesia (and reduction of inflammation (NSAIDs)). During the surgeries the animals will be anesthetized and will receive mechanical ventilatory support (after intubation). After arousal from anesthesia, animal comfort will be closely monitored and extra analgesia will be administered in case of discomfort. Prior to the surgery procedures, the animals will be trained for cooperating with blood sampling so that the situation is familiar to them. Total blood draw volume will be restricted to max 8 mL/kg in two weeks.

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

See refinement and H.(Pain and pain relief)

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

As far as we know no other group in the Netherlands has tested biodegradable vascular access grafts.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

For the repeated puncture experiments the goats will need to be housed separately, due to the increased risk of damage by physical contact that comes with the graft lying closer to the surface. But to ensure easy access to the vessel needed for repeated puncturing, we want to implant the vessel closer to the surface in a skin fold in the neck. They will however be housed in proximity to other goats in the same room and can see, smell and hear the other animals.

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Prior to surgery adequate pain medication, after consultation with an experienced veterinarian, will be administered peri-operatively (day -1 to day +4) for analgesia and reduction of inflammation (NSAIDs). The animals will be anesthetized for the embolization/ (or surgical nephrectomy). After arousal from anesthesia, animal comfort will be closely monitored daily and extra analgesia will be administered in case of signs of discomfort.

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

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

After implantation of the scaffold, both the site of implantation may get infected. The inflammatory response against the synthetic scaffold is an integral part of the *in situ TE* approach. We do not expect

side-effects as a consequence of the placement of a synthetic vessel.

There is a possibility that the implanted graft becomes occluded due to thrombosis or NIH.

Explain why these effects may emerge.

During the implantation surgery, an incision in neck will be made to allow access to the jugular vein and carotid artery. This may lead to infections post-surgery.

Due to the increased outflow on the vein side of the anastomoses endothelial damage might occur leading to the formation of NIH. Also due to the clamping of the vessels, there is a time of ischemia and possible vessel injury might occur which both can lead to thrombosis.

With every embolization procedure (also in humans) there is a small chance that a post infarction syndrome or complications such as hematoma or adjacent organ necrosis occur<sup>4</sup>. Although we aim for a stable uremic milieus without the need for daily dialysis, the kidney injury induced by embolization (or surgery) during the development of the model may happen to be too severe.

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

The implantation procedures will be performed by an experienced vascular surgeon. In addition, the implantation techniques will be practiced prior to the start of the experiment on anesthetized goats in a different study. This allows us to gain experience with accurately determining the approach and procedure, reducing the risk of unnecessary blood loss and reducing ischemia time. After the procedure animal comfort will be closely monitored and extra analgesia will be administered if necessary. In case of severe symptoms due to inflammation or occlusion the animals will be euthanized to prevent further suffering.

#### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Human endpoints will be reached when graft occlusion of more than 80% is perceived on both sides and in case of abnormal and/or behavior, stereotype labored breathing, unexpected significant loss of weight, untreatable infection, rough hair coat/ unkempt appearance, lethargy, neurological signs or any condition interfering with daily activities (e.g. eating or drinking, ambulation).

Indicate the likely incidence.

Studies in humans have shown that primary patency failure (short after/during surgery) for ePTFE grafts lies around 20% and that ultimately graft occlusion occurs in 50% of the implanted ePTFE graft after one year<sup>2</sup>. Due to our time point for our initial study (with ePTFE) set at a maximum of 3 months and due to the fact that we implant bilateral we estimate that 5% will meet this criteria for due to primary patency failure and 5% due to secondary failure in both grafts. So in total 10% will meet this criteria before the end of the study due to the graft occlusion.

#### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

**Level of discomfort: moderate.**

In the case of the implantation studies we expect that the animals will experience short-term moderate suffering after the surgery and from the repeated imaging procedures needed to monitor the grafts. In addition, for the repeated cannulation studies we expect that the animals will experience short-term moderate suffering due to the puncturing of the vessel.

In the case of the uremic animals we expect that the animals will experience short-term moderate suffering after the embolization (or surgical nephrectomy). We aim to induce a degree of chronic kidney failure that causes a stable uremic milieu (urea preferably  $\geq 15$  mM and creatinine preferably  $\geq 250$  uM) without the need for daily dialysis. With this degree of kidney failure the animals will experience moderate impairment of the well-being and general condition (e.g. fatigue) due to accumulation of waste solutes. (Note: the kidney injury induced by embolization (or surgery) may happen to be too severe, causing severe symptoms due to accumulation of excess water (e.g. pulmonary edema) and severe hyperkalemia ( $\geq 6.5$  mM) necessitating daily dialysis, which will severely impair the well-being of the animals. In this case the animals will be killed to prevent further suffering.)

Although we have very good experience with goats, the embolization/ nephrectomy procedure carries a risk in this species. Goats are ruminants and are susceptible to bloat, an over distention of the reticulorumen (the first two stomach chambers) with gases of fermentation, which may occur after the embolization/ nephrectomy procedure due to discomfort leading to anorexia, which causes microbial dysbiosis in the reticulorumen. Bloat is associated with a high mortality. In addition, disruption of the microbial flora caused by anorexia, will also hamper adequate ruminal fermentation (required for efficient fiber digestion) when the goats start eating again. This will also have major impact on the goats' health. Together with a very experienced veterinarian, we will make every effort to prevent these complications by applying optimal postoperative analgesia and careful monitoring of the goats. However, if -despite careful monitoring and optimal analgesia- disruption of the microbial flora occurs, we will consider to transfer ruminal fluid from healthy goats to the affected goat via a stomach tube to boost the ruminal fermentation as last rescue. If this the additional treatment is not curative we consider this as a humane end-point.

If despite all these measures the induction of chronic kidney failure in goats is accompanied by too much morbidity or mortality we have to cease the use of an uremic model and have to make do with the knowledge gained in our rat CKD model.

**Reference list:**

- 1: Lemson, M. S., Daemen, M. J., Kitslaar, P. J., & Tordoir, J. H. (1999). A new animal model to study intimal hyperplasia in arteriovenous fistulas. *The Journal of Surgical Research*, 85(1), 51-8. <http://doi.org/10.1006/jssr.1999.5566>
- 2: Misra, S., Gordon, J. D., Fu, A. A., Glockner, J. F., Chade, A. R., Mandrekar, J., ... Mukhopadhyay, D. (2006). The Porcine Remnant Kidney Model of Chronic Renal Insufficiency. *Journal of Surgical Research*, 135(2), 370-379. <http://doi.org/10.1016/j.jss.2006.04.001>
- 3: Eschbach JW, Adamson JW and Dennis MB: physiologic studies in nonnal and uremic sheep: I. The experimental model. *Kidney International* 1980; 18: 725-31.
- 4: Schwartz, M. J., Smith, E. B., Trost, D. W., & Vaughan, E. D. (2007). Renal artery embolization: Clinical indications and experience from over 100 cases. *BJU International*, 99(4), 881-886. <http://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06653.x>

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be killed up to 6 months after implantation and extensive work will be conducted on morphology of the scaffold using immunohistochemistry (IHC; to define cellularization in general and macrophage subtype, presence of endothelium and extracellular matrix (ECM) components) and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR)). Other relevant tissues (e.g. heart, bone marrow,

kidney and carotid/jugular remnant will also be collected to assess weight, morphology and cellular infiltrate.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11547	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Designing optimal TE vascular grafts in the rat

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

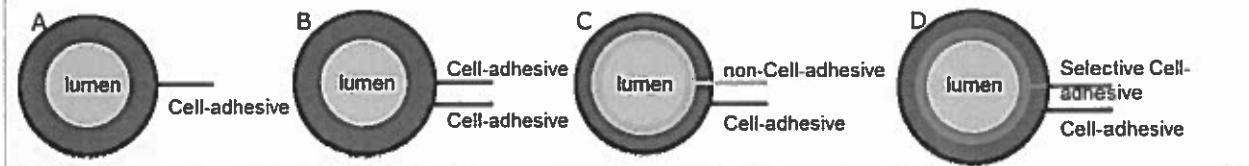
With the experiments in step 1a, we want to study the influence of chronic kidney disease (CKD) versus healthy rats on tissue formation and wound healing over time after *in situ* TE (see outline 3.4.2). By comparing rats with CKD to healthy controls, we will be able to investigate the influence of the pathology CKD on tissue formation and wound healing on *in situ* TE. By studying the tissue formation over multiple time points over a period of ultimately 5 months we anticipate to gain knowledge in the successive process involved in tissue formation and the respective influence of CKD on the different processes involved. This will allow us to adapt our future scaffold design on the tissue formation abilities of CKD patients. Firstly, this will be done with an scaffold composed of a single layer (fig. 1 - A) to test our material and investigate which processes need to be actively regulated by our scaffold design.

With the knowledge gained on the influence of CKD on *in situ* TE and of our transplantation studies in the goat model (appendix 1), we want to test our different design possibilities to maximize the tissue remodeling of our vascular graft. So, in step 2 we want to study whether or not adding functionalization to the scaffolds we will enable us to can improve tissue formation and wound healing. Due to the fact that a native blood vessel is composed of multiple layers we expect that multi-layered scaffolds will aid in the specific tissue formation required for each layer. The possible design choices that are comprised of a plain double layered graft (fig. 1 - B) with adjusted mechanics(pore size, fiber diameter, elasticity, etc.) to aid the specific tissue formation. To prevent possible NIH a third design can be used with comprises of a non-adhesive luminal layer(fig. 1 - C). We are also researching the possibilities of creating an selective bio-functionalized layer, which attracts specific cells associated with wound healing(fig. 1 - D). We are currently planning to use Stromal-derived factor 1 (SDF-1 $\alpha$ ), due to the fact that we have had successful results in attracting stem cells and accelerating healing. Other chemoattractant are currently being investigated *in vitro* for their possible application in the future.

Depending on the outcomes of our experiments researching the influence of CKD(step 1a) and the testing our graft in clinical diameters(step 1b) we want to use the designs above(or combination of designs) to adjust our graft as good as possible to clinical conditions.

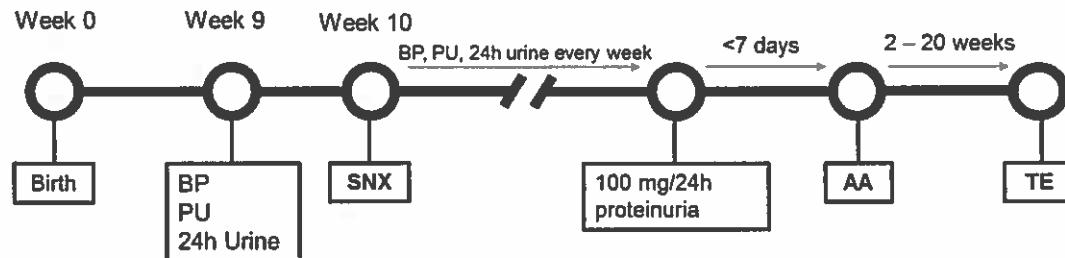
To accomplish our goals, we will use adult female rats in which CKD is induced using a single surgical intervention. To assure a comparable degree of CKD, a threshold has to be reached before a scaffold shall be implanted. By studying effects of CKD, we will be able to determine whether the alterations in function of (circulating) stem cells, the vascular and immune system in CKD will affect the process of *in situ* TE. From our long term disease model studies (step 1a) we will gain insight in the possible differences in tissue formation over time in CKD and healthy controls. This gained knowledge will enable us to accommodate our implantable graft to the conditions of CKD and to create a clinical applicable graft that is able to cope with these adverse conditions. We will combine this gained knowledge with our outcomes from the goat model and *in vitro* data, to test the most promising functionalization designs(figure 1A-D) (step 2). The outcomes from these studies will finalize in the creation of one final design that will be used for the implant studies in goats (step 3 and 4 Appendix 1) with or without renal disease. This will allow us to validate the workflow and additionally double check the importance of a promising functionalization candidate.

**Figure 1 – Potential designs to improve graft functionality** A: Single layer bare scaffold to test material under *in vivo* conditions. B: Double layer different mechanical properties C: Double layer including a non-adhesive luminal layer D: Double layer with a selective cell-adhesive layer to promote tissue formation. In our final design one or a combination of multiple designs will be used to create a graft that meets the challenge that transplantation in uremic patients brings.



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

In these experiments we want to compare CKD versus healthy animals on outcome after *in situ* TE, with and without functionalization. A surgical model of CKD, namely 5/6th nephrectomy (SNX), will be studied in comparison to weight-matched sham-operated controls. Both in our laboratory and world-wide, the SNX model is a well-studied, reproducible ge after implantation when it is still composed of non-cellular or non-cell-derived tissue. Tail cuff pressure and blood urea will also be measured at multiple time points after scaffold implantation (e.g. once a week). At the end-point, under full anesthesia, kidney function will be assessed and intra-arterial catheters will enable us to measure the drop in pressure over the scaffold while



**Figure 2 – Experimental set-up implantation studies.** 9 weeks after birth a base line measurement of blood pressure (BP), Proteinuria (PU) and 24h urine production is established. A week later, the subtotal nephrectomy (SNX) is created. After SNX BP, PU and 24h urine production is measured every week to determine threshold values. After reaching threshold values for two consecutive weeks CKD is established and implantation by aortic anastomosis (AA) is performed 7 days later. Depending on the cohort implantation time will vary between 2 and 20 weeks, followed by terminal experiments (TE) to measure graft patency and kidney function.

a flow probe will enable us to measure flow through the scaffold. All *in vivo* measurements will be followed by *ex vivo* studies on isolated tissues.

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

#### **Rat CKD model Experiments (1A)**

To avoid experimental variation, all experimental groups will be studied longitudinally in balanced cohorts. The major readout-parameter (CKD) is robust enough not to be influenced by a variety in genetic background. The variety in genetic background in patients with CKD is moreover an advantage of using this model, increasing its translational validity. CKD may influence the patency after aorta implantation due to changes both in blood flow and changes in thrombogenicity. While proteinuria may lead to increased thrombogenicity, CKD without excessive proteinuria may lead to bleeding tendencies. We therefore estimate that 35% of the animals with CKD will have to be euthanized before or after implantation but before reaching the planned end point in the experiment.

We expect a total survival rate around 55% (maximum 5% technical failure SNX + 5% technical failure graft implantation + 10% CKD-related HEP +25% nonfunctional blood flow through graft, see also **Humane End Points**). For sham animals we expect a maximum 5% technical failure graft implantation +20% non-functional blood flow through graft, see also **Humane End Points**.

Summarizing:

Survival sham groups = 75%  
Survival CKD groups = 55%

Multiple studies have shown that the regenerative potential of stem cells in CKD both *in vivo* and *in vitro* is less than in the healthy situation.<sup>2-4</sup> We know from a previous study has already shown stem cell function declines under conditions of CKD using a rat model<sup>3</sup>. They show and decrease in proliferation capacity (cell population doubling time) of  $116.1 \pm 57.7$  h ( $n = 6$ ) vs.  $43 \pm 8.2$  h in H-MSC ( $n = 5$ );  $p = 0.02$ . With an effect size = 1.77, Power = 0.8 and alpha = 0,05, we calculated the amount of animals necessary using t-test for two groups, one-way. The outcome was  $n = 5$ , specific for the readout parameter of MSC doubling time. So per time point we need 5 animals per group. With 5 time point (2 weeks, 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks and 20 weeks) and 5 animals per group, we need 25 animals per group.

If we correct for the maximum calculated failure rates.

CKD animals  $46 \times 0.55 = 25.3$  usable animals = **46 animals needed**  
Sham animals  $34 \times 0.75 = 25.5$  usable animals = **34 animals needed**

**Total of 80 animals.**

#### **Design tests(2)**

The rationale for performing this study *in vivo* is fully based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. By taking these results into account, we are able to make an power calculation, thereby reducing the number of animals required. We know from a previous study has already shown that bio-functionalized grafts *in vitro* are able to increase initial monocyte recruitment in a dynamic setting<sup>5</sup>. Unpublished results from our laboratory show that this principle also holds true *in vivo* and may therefore positively influence tissue formation outcome.

To show how we have calculated the amount of animals necessary for our experiments, an example showing an experiment with 5 experimental groups representative of **Step 2** (figure 3 – project voorstel) is given.

In this example, we will compare the possible different experimental groups.

- 1) bare graft
- 2) double layered
- 3) non-cell adhesive
- 4) bio-functionalized
- 5) possible combination of above designs

We found that changing the biomaterial leads to a significant difference in macrophage polarization: material 1: 130.5 +/- 19.3 vs material 2: 176.0 +/- 21.7, in which the amount of cells was normalized for CD68, a pan-macrophage marker. This marker will be prominent in the beginning of tissue formation and graft remodeling due to the nature of the perpetual process of wound healing. Since long term experiments on tissue formation have not yet been conducted. We take the variation we found in a previous short term study on macrophage polarization. This marker will be less prominent in later time points, but indications show that this onset marker is a good indication of wound healing later on. For our final read-out to determine cell infiltration and remodeling we will use CD31 and V-CAD as important markers for endothelial cells in addition to  $\alpha$ -SMA for smooth muscle cells(implicated in NIH formation).

Bio-functionalization experiments have previously not been performed, the change of biomaterial in this setting is taken as an approximation for this phenomenon. In this study, the effect size was 2.21, with n=12 per group (calculated power = 0.99). As an example of primary readout, the amount of CD68 is also used. With an effect size = 2.21, Power = 0.8 and alpha is corrected for the number of comparison between experimental groups. We calculated the amount of animals necessary using F-test for ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way. **The outcome was n = 10**, specific for the readout parameter CD68. We believe that this is also the minimum amount of animals needed to see differences in readout-parameters in our study. If we then add the survival rate, where we expect a maximum failure of 45% (If we use CKD animals). We can calculate that we need  $19 \times 0.55 = 10.45$  usable animals = 19 animals needed per experimental group per possible time point. If we use the same time points as in the CKD experiments (2A), we have a total of 5 time points. 5 groups x 5 time points x 19 animals = 475 animals to study our possible designs.

#### **Training**

To minimize mortality in the sense of technical failure, training will be necessary to master the 5/6th nephrectomy and the graft implantation procedures. Collecting data from a terminal experiment (renal clearance via PAH and Inulin measurements), also requires extensive practice. Based on these previous calculations and experience in how long training will take on average, we predict that we will need N=25 animals (with N=5 for SNX, N=10 for abdominal aorta end-to-end anastomosis and N=10 for terminal measurement) for training. Training of end-to-end anastomosis will only commence after the researcher in question has completed a microsurgery course (e.g. UMC Groningen or elsewhere) and if applicable, one animal will be used to practice both interventions in order to limit the number of animals. If possible and available, surplus animals are used for training purposes.

**Total animals= 80(2A) + 475(2B) + 25(training) = 580 animals**

#### **B. The animals**

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

The Sprague-Dawley (SD) rat is an outbred model and Hsd:Sprague Dawley®™ (SD®™) rats are bred by Harlan in the Netherlands. Adult females only will be used. The SD rat is very easy to handle and is commonly used as a 5/6th nephrectomy model. To minimize the variation in our readout-parameters, the female outbred SD model based on weight is preferred. Female rats are expected to reach 300g of body weight after 4 months of age, on the flat part of the growth curve (website Harlan), and thus females of +/- 20 weeks will have reached this body weight upon implantation. This is important because the graft cannot grow in the initial stage after implantation when it is still composed of non-cellular or non-cell-derived tissue. The progression after the 5/6<sup>th</sup> nephrectomy (proteinuria, serum urea and tubulointerstitial damage) is similar to conditions of human CKD patients. Additionally, the progression of CKD seems to be less severe in females (previous observations) allowing for the longer implantation time intended for this study.

**Numbers see: A.3 (above)**

#### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

##### Replacement:

The rationale for performing this study *in vivo* will be fully based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. Besides using blood from healthy volunteers, *in vitro* experiments may be complemented by the use of patient material (e.g. blood of CKD patients). However, *in vitro* studies alone will not suffice to act as pre-conditional input for the *in vivo* studies. *In vitro* data will not give us sufficient insight into the process of tissue formation and wound healing, due to factors such as signaling from and to the bone marrow. Thorough searches of the literature have confirmed that experiments performing *in situ* TE in uremic rodents have not been previously conducted.

##### Reduction:

To gain as much information as possible from a single animal, we will perform different types of measurements. After implantation, we will assess different hemodynamic parameters to assess pressure and flow in blood vessels and/or cardiac function. After the experiment, we will explant the scaffold to look at cellular content and tissue-specific layering. Moreover, other relevant tissues will be collected to assess morphology and cellular infiltrate.

##### Refinement:

As for refinement, all surgeries will be performed by experienced surgeons. Animals will be group-housed and given cage enrichment. Moreover, a pain relief protocol after 5/6th nephrectomy has already been established with the help and approval of associated veterinarians. A new optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists.

CKD animals will first undergo surgery to implant 'bare' scaffolds. If the disease model is not compatible with the implantation of an abdominal scaffold (e.g. survival < 50%), this is considered a 'no go' moment and in close consolidation with the IVD, decisions will be made concerning Step 2b and Appendix 1. To validate renal injury and further reduce experimental variation, a threshold of 100 mMol/L for established CKD has been chosen before the implantation of the experimental scaffold. Due to experienced and skilled personnel, CKD can be reliably and repetitively be induced. Moreover, minimizing variability will also be accomplished by using female animals only and selecting based on weight, assuring that vascular growth will not compromise the experiment. Based on previous experiments, we are able to persistently induce CKD in the rat using the 5/6th nephrectomy model<sup>2</sup>, thus minimizing mortality due to technical failure (< 5%).

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

Previously approved projects using the 5/6th nephrectomy model at our department have already made use of an optimized protocol for pain relief, which will be applied for up to 48 hours after surgery. This protocol has previously been established with the help and approval of associated veterinarians. A new optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians.

An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists. Moreover, extensive training is given to optimize the complex surgical procedures before the start of the experiment.

## Repetition and duplication

### **E. Repetition**

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

nvt

## Accommodation and care

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### **G. Location where the animals procedures are performed**

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Prior to the surgical procedures, in close consultation with an experienced veterinarian, adequate pain relief is administered. Extra analgesic in the form of is administered during surgery if signs of discomfort occur. All surgical procedures are performed under full anesthesia. Post-surgery pain relief is given for up to 48 hours after surgery. Drawing of blood from the tail vein is performed under a brief narcosis.

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

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

After surgical intervention to induce CKD, animals may lose weight and develop inflammation or fever. During the follow-up period before animals have reached the proteinuria threshold, general health may decline. After implantation of the scaffold, both the site of implantation and the intestines may get infected. The inflammatory response against the synthetic scaffold is an integral part of the in situ TE approach. We do not expect side-effects as a consequence of the placement of a synthetic vessel.

Explain why these effects may emerge.

CKD will be induced in a single surgery. Through incisions in the flanks, one kidney will be removed as a whole while the poles of the second kidney will be cut. During recovery, rats may develop inflammation of the incision sites and/or fever. During follow up general health may decline due to build-up of toxins in the blood, normally cleared by the kidney. During the implantation surgery, the intestines have to be temporary be placed outside the abdominal cavity to allow access to the aorta. This may lead to intestinal infections post-surgery. The incision length over the linea alba stretches from just below the diaphragm until the genital area and may get potentially infected after closure.

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

All surgeries will be performed by experienced staff, to decrease overall surgery time and specifically the ischemia-time. Surgeries will be performed under aseptic conditions to minimize the risk of infection. During surgeries the animals will be placed on a heat mat to maintain a body temperature. Body temperature, heart rate and breathing will be closely monitored during surgery.

After implantation of the scaffold, patency of the scaffold will be assessed while the animals are still under anesthesia. When patency cannot be assured due to the presence of a thrombus, anti-thrombolytic therapy (e.g. Plavix) can be administered. Animals that show patency of the graft will still be checked the first 7 days for hind-limb ischemia (see J, humane eindpunten). Moreover, all animals will be monitored closely after implantation surgery for changes in general clinical characteristics. Animals will be checked for motility and cleaning behaviour. Weight and temperature will also be monitored. Possible interventions in animals with altered clinical characteristics include individual housing, altered diet (water-based powder chow) and an increased or prolonged amount of analgesia. In close consolidation with the IvD, animals that show no improvement in health will be excluded and euthanized.

**J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The study is designed to restrict discomfort as much as possible and apply HEPs when necessary. During this experiment, we expect only a low mortality of animals. Both technical failure of 5/6th nephrectomy (SNX) and technical failure of scaffold implantation are thought to occur in less than 5% of the animals (own observations) when performed by skilled micro surgeons. However, we do expect it is necessary for a part of the animals to be euthanized before the end of the experiment, both to prevent increased discomfort ('ernstig ongerief') and mortality. So there is a clear distinction between interim model-related mortality (which we prevent as much as possible by assessing humane-end points), technical failure (which will be low) and reaching a humane-end point (HEP, which will be assessed). Our **first humane-endpoint (1)** will consist of monitoring general health after induction of CKD but before implantation of a vascular scaffold. Our **second HEP (2)** will consist of assessing the patency of the scaffold after implantation. For the implantation of the vascular scaffold, it is necessary to temporally clamp the aorta to prevent bleeding. In some cases, this ischemia and subsequent reperfusion can lead to irreversible damage in downstream tissues of the abdominal aorta. A clear example of this damage is paralysis of the hind legs. If the scaffold fails to be patent, for instance due to thrombus formation and anti-thrombogenic therapy does not improve the patency, the animal will be excluded and killed. A previous study on healthy SD rats showed patency of 85% 4-8 weeks after implantation of an abdominal aorta scaffold. Additionally, in a recent study done by the Tu/e with similar materials (unpublished results) they see a survival up to 5 months of 90%, with the failure rate predominantly in the first period of the experiment following surgery. We estimate 15% of this 20% sham (or 20% of 25% CKD) will be excluded during surgery after anti-thrombogenic therapy and 5% after a positive cage-lid test. The 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever the cage-lid test is positive for one or more limbs. To prevent this mortality and increased discomfort due to ischemia in downstream targets of the aorta, we choose to implement the cage-lid test and actively prevent mortality, taking animals out of the study that are at risk of increased discomfort. Our **third HEP (3)** will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The **fourth HEP (4)** will consist of monitoring weight loss, infection and general health after scaffold implantation. The most common signs of increased discomfort in the current study

will be: 1) Paralysis of the hind limbs, visible in the first days after the implantation of the vascular scaffold 2) Persistent infection of the abdominal region after placement of the vascular scaffold 3) Paralysis of other limbs and necrosis of tissue due to occlusion of the vascular scaffold All these signs will serve as exclusion criteria and the animals will subsequently be killed to prevent increased discomfort and mortality. CKD may influence the patency after aorta implantation and may influence the healing process. We therefore estimate that an additional 20% of the animals with CKD will have to be killed before the end of the experiment. This would mean that we estimate 45% of CKD animals will be killed before the end of the study, while 25% of the sham animals will be killed before the end of the study.

Indicate the likely incidence.

See above

#### K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

This experiment is determined as 'matig ongerief'. Animals will undergo a maximum of two surgical events (induction of kidney disease or sham and scaffold implantation) plus follow-up. Reaching the threshold of renal disease is expected to vary between animals, with an average of 11 weeks. Blood collection for monitoring CKD progression will be done under light anaesthesia from the tail vein ("licht ongerief"). Side effects of developing CKD may include weight loss and overall decreased wellbeing (raised fur). Animals that will be excluded and euthanized during the implantation will either experience 'matig ongerief' (CKD) or 'licht ongerief' (sham) due to preceding sham or surgical event. Animals excluded during surgery (estimated 15% sham en 20% CKD) will not experience extra discomfort since they will be euthanized under anesthesia. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever signs of paralysis emerge. Since the first 48h after surgery, analgesia will be given and 2 cage-lid test are performed during this time-frame, we estimate the discomfort of these animals 'matig ongerief' (both sham and CKD). As described, we want the animals in this experiment to have a maximum of 'matig ongerief', due to the nature of the interventions and the duration of the experiments. All animals with deteriorating health will be humanely euthanized before reaching 'ernstig ongerief'. When explanting the grafts at the end time points of the experiment we will conduct a terminal experiment to measure flow and patency of the graft, animals will be terminated at the end under anesthesia.

We expect a total survival rate around 55% (maximum 5% technical failure SNX + 5% technical failure graft implantation + 10% CKD-related HEP +25% nonfunctional blood flow through graft,. For sham animals we expect a maximum 5% technical failure graft implantation +20% non-functional blood flow through graft(see also Humane End Points.)

Summarizing:

Survival sham groups = 75%

Survival CKD groups = 55%

Procedure	Expected levels of discomfort
Induction of kidney disease	matig ongerief
Sham operation	licht ongerief
Scaffold implantation	matig ongerief
Blood collection	licht ongerief
Terminal experiments	non-recovery

#### Reference list:

1. Muylaert, D. E., Fledderus, J. O., Bouten, C. V., Dankers, P. Y. & Verhaar, M. C. Combining tissue repair and tissue engineering; bioactivating implantable cell-free vascular scaffolds. *Heart* 100, 1825–1830 (2014).
2. van Koppen, A., Verhaar, M. C., Bongartz, L. G. & Joles, J. A. 5/6th nephrectomy in combination with high salt diet and nitric oxide synthase inhibition to induce chronic kidney disease in the Lewis rat. *J. Vis. Exp.* 3, e50398 (2013).
3. Klinkhammer, B. M. et al. Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS One* 9, (2014).
4. Drewa, T. et al. Bone Marrow Progenitors From Animals With Chronic Renal Failure Lack Capacity of In Vitro Proliferation. *Transplant. Proc.* 40, 1668–1673 (2008).

5. Smits, A. I. P. M., Ballotta, V., Driessens-Mol, A., Bouteren, C. V. C. & Baaijens, F. P. T. Shear flow affects selective monocyte recruitment into MCP-1-loaded scaffolds. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 2176–2188 (2014).

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be euthanized at maximum 5 months after implantation and extensive work will be conducted on morphology of the scaffold using immunohistochemistry (IHC; to define cellularization in general and macrophage subtype, presence of endothelium and extracellular matrix (ECM) components) and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR)). Other relevant tissues (e.g. heart, bone marrow, kidney and aorta remnant will also be collected to assess weight, NIH, morphology and cellular infiltrate. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements will allow correlation between morphology of the scaffold and expression profiles in CKD versus control animals with and without functionalization.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11547				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht				
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"> <tr> <th>Serial number</th> <th>Type of animal procedure</th> </tr> <tr> <td>3</td> <td><i>In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in a uremic large animal model</i></td> </tr> </table>	Serial number	Type of animal procedure	3	<i>In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in a uremic large animal model</i>
Serial number	Type of animal procedure				
3	<i>In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in a uremic large animal model</i>				

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The overall goal of these experiments is to test the *in situ TE* capacities of our designed grafts to deal with clinical conditions. Because these grafts are implanted in uremic patients, the environment in which the *in situ TE* process is conducted is substantially different from healthy wound healing conditions.

That is why we want to subject our graft design to uremic conditions to ensure that the remodeling process is warranted when we move towards the clinic. Currently our group is developing a uremic goat model for testing novel dialysis techniques. When this research results in a workable model we like to use this to investigate the effect of uremic conditions on the *in situ TE* process involved in our graft remodeling. In first instance, bilateral subtotal renal angiographic embolization (by using polyvinyl alcohol particles) will be applied to create a chronic kidney failure model. Embolization is minimally invasive (does not require an open surgical procedure) and is therefore expected to result in a shorter recovery time, less morbidity and less post procedure complications than surgical nephrectomy. If not successful, e.g. due to animal discomfort or unsuccessful embolization, they will move over to surgical nephrectomy.

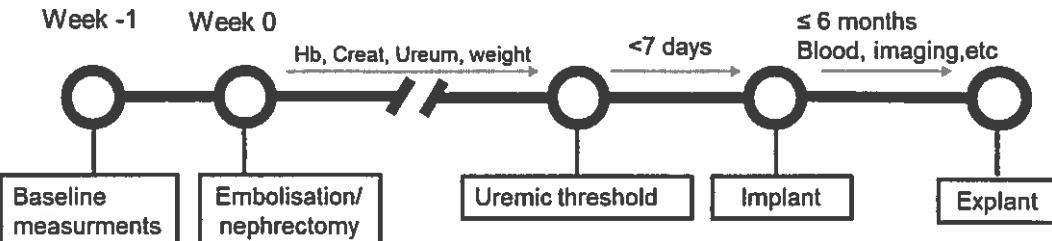
For the partial embolization (or partial surgical nephrectomy), we will therefore aim for 75-80% reduction in functional kidney mass in first instance (followed by total embolization (or surgical nephrectomy) of the contralateral kidney). Since the left kidney lies deep in the left retroperitoneum and is difficult to access by open surgery, we will start with partial embolization of this kidney so that we can proceed with surgical total nephrectomy of the more easily accessible right kidney if embolization turns out to result in too much animal discomfort. On the contrary, if we need to move over to a complete surgical procedure, we will start

with partial nephrectomy of the more easily accessible right kidney followed by total nephrectomy of the left kidney. Clinical condition will be monitored daily, including animal comfort, hydration status and body weight. Urea, creatinine and potassium concentrations will be measured on alternate days. Depending on the results we will adjust the percentage reduction in kidney mass in consecutive procedures accordingly. When they are successful in establishing and validating this model, we will proceed to use this model for our implantation experiments (similar to previously described in 1a) to assess the *in situ* TE remodeling of our vascular access grafts under uremic conditions for up to 6 months.

In case of the usage of uremic goats, we have ample experience with hemodialysis in goats. Although we have very good experience with goats, the embolization/ nephrectomy procedure carries a risk in this species. Goats are ruminants and are susceptible to bloat, an over distention of the reticulorumen (the first two stomachs chambers) with gases of fermentation, which may occur after the embolization/ nephrectomy procedure due to discomfort leading to anorexia, which causes microbial dysbiosis in the reticulorumen. Bloat is associated with a high mortality. In addition, disruption of the microbial flora caused by anorexia, will also hamper adequate ruminal fermentation (required for efficient fiber digestion) when the goats start eating again. This will also have major impact on the goats' health. Together with a very experienced veterinarian), we will make every effort to prevent these complications by applying optimal postoperative analgesia and careful monitoring of the goats. However, if -despite careful monitoring and optimal analgesia- disruption of the microbial flora occurs, we will consider to transfer ruminal fluid from healthy goats to the affected goat via a stomach tube to boost the ruminal fermentation as last rescue. If despite all these measures the induction of chronic kidney failure in goats is accompanied by too much morbidity or mortality we have to cease the use of an uremic model and have to make do with the knowledge gained in our rat CKD model.

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

In first instance, bilateral subtotal renal angiographic embolization (by using polyvinyl alcohol particles) will be applied to create a chronic kidney failure model. Embolization is minimally invasive (does not require an open surgical procedure) and is therefore expected to result in a shorter recovery time, less morbidity and less postprocedure complications than surgical nephrectomy. If not successful, e.g. due to animal discomfort or unsuccessful embolization, they will move over to surgical nephrectomy. Studies in sheep (closely related to goats) showed that 5/6 or 14/15 nephrectomy resulted in a uremic state that was respectively too mild (urea ~10-15 mm, creatinine ~200 um) or too harsh (dialysis required in ~50% of the animals within one week, urea in animals not on dialysis  $34 \pm 2.5$ mm and creatinine  $424 \pm 35$ um)<sup>3</sup>. For the partial embolization (or partial surgical nephrectomy), we will therefore aim for 75-80% reduction in functional kidney mass in first instance (followed by total embolization (or surgical nephrectomy) of the contralateral kidney). Since the left kidney lies deep in the left retroperitoneum and is difficult to access by open surgery, we will start with partial embolization of this kidney so that we can proceed with surgical total nephrectomy of the more easily accessible right kidney if embolization turns out to result in too much animal discomfort. On the contrary, if we need to move over to a complete surgical procedure, we will start with partial nephrectomy of the more easily accessible right kidney followed by total nephrectomy of the left kidney. Clinical condition will be monitored daily, including animal comfort, hydration status and body weight. Urea, creatinine and potassium concentrations will be measured on alternate days. Depending on the results we will adjust the percentage reduction in kidney mass in consecutive procedures accordingly. When they are successful in establishing and validating this model, we will proceed to use this model for our implantation experiments (similar to previously described in 1a) to assess the *in situ* TE remodeling of our vascular access grafts under uremic conditions for up to 6 months.



**Figure 1 – Experimental set-up implantation studies in an uremic goat model.** One week before implantation a base line measurement base line measurement of hemoglobin (hb), creatine (Creat), ureum and weight is established. At week 0 the embolization/nephrectomy is performed. After reaching the uremic threshold the graft is implanted within a week. After implantation blood will be taken periodically and the graft will be monitored by imaging for up to 6 months, when the graft is explanted.

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

For the uremic animal model we are currently dependent on the outcome and validation of the model goats in a currently ongoing project in our group. This allows us to gain experience with accurately determining the extent of the embolization/nephrectomy for this study. In this way we don't have to conduct our own pilot studies for developing the model and reduces the occurrence of unexpected technical problems and increase the likelihood of successful establishment of a stable uremic model suitable for implantation. Since the range between a uremic state that is either too mild (with low uremic toxin levels) or too harsh (necessitating frequent dialysis) is very narrow, we expect to get an 80% success rate of creating a usable uremic model for transplantation (urea preferably  $\geq 15$  mM and creatinine preferably  $\geq 250$   $\mu$ M). When we combine this dropout of 20%, that will not will have a stable uremic state for inclusion, with our estimate survival for transplantation, with the maximum 5% technical failure scaffold implantation and the dropout rate of approximately 25% of animals with nonfunctional blood flow through scaffold), we estimate a 50% of animals will reach the end-point. Since these implantation experiments under clinical conditions have previously never been performed we conduct the same effect calculation as for our puncture study for clinical relevance (also 2 groups). We estimate that we need to use 6-12 goats per study (3-6 per group), which will allow for the detection of a decrease or increase of the outcome parameters of 30% (to reach clinical significance) when the estimated relative standard deviation is 25-30% and the alpha level is 0.05 at 80% power. We believe that the variation in reality might even be lower. So we need a maximum of 12 goats to complete the study. When we correct this for our calculation of reaching the end of the experiment(maximum 5% technical failure scaffold implantation + 25% nonfunctional blood flow through scaffold and 20% dropout due to non-stable uremic conditions). **We need a maximum of 12/.5 = 24 animals per group with a total of 48 animals**

## B. The animals

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

We will use adult Dutch white female goats, because these animals are docile (can be easily trained), have a long neck with accessible veins and have body weights (50-100 kg) and distribution volumes that are comparable to humans. In the neck, the arterial diameter of the goat resembles that of human elbow vessels, being 3-5 mm. The venous diameter is slightly larger and varies between 5 and 9 mm, compared with 4-8 mm in human elbow veins. This similarity in vessel diameter implies similarity in hemodynamic properties of the graft fistulas created in humans and in the neck of goats. We will not use male goats, because they are less docile (difficult to train) and more difficult to house in a group (with consequences for the level of discomfort). Additionally, females will not go into estrous in the absence of male goats, adding male goats will add the complication of a hormonal cycle in the females. Furthermore, the behavior of male goats can lead to increased physical contact and can be potentially dangerous in combination with a graft implant. The goats will be purchased from a commercial farm. And we need a total of 48 animals(see above).

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

##### Replacement:

Prior to the *in vivo* experiments, extensive *in vitro* testing of the graft have been (or will be) performed to validate efficacy, biocompatibility and mechanical strength of the grafts *in vitro*. However, the *in vitro* situation profoundly differs from that *in vivo*; for proper evaluation of *in vivo* kinetics and influence on tissue formation, wound healing, NIH and hemodynamic implantation *in vivo* testing will be inevitable, including implantations in a large animal uremic model.

Since no uremic model in goats is currently available in the Netherlands/ Europe, the model has to be developed. Also the multifactorial effect of uremic conditions that can potentially influence the TE process is unattainable *in vitro*.

##### Reduction:

Because we implant the grafts bilateral we will need fewer animals. This ensures that individual are part of multiple cohorts, limiting the amount of animals needed. Also due to less inter-individual variability we hope to achieve statistical significance with fewer animals. To limit the number of animals required for the *in vivo* efficacy validation, we will, in first instance, use healthy animals. Additionally, to rule out any systemic effects of our graft material we make use of sham animals, that will only get a one sided implantation.

We will use the outcomes of our first experiments in goats to further design and test different designs and functionalities *in vitro* and with the use of the rat model described in appendix 2. This way we can fine tune our design and take into account the influence of CKD on the tissue remodeling and degradation. Due to this intermediate validation we will can already take informed choices before going to pre-clinical phase in the goat, thus limiting the amount of goats needed.

After gross evaluation of performance, efficacy and safety in healthy animals, a series of experiments will be required in a limited number of animals with chronic kidney failure, since comparison to the golden standard is previously established. In addition, the embolization and surgical nephrectomy techniques on anesthetized goats are currently being performed in a different study (approval has been obtained from the DEC). This allows us to gain experience with accurately determining the extent of the embolization/nephrectomy and reduces the chance of loss of animals.

##### Refinement:

We will provide cage enrichment with a brush and a step/ stair. The animals will be trained for standing in a box, wearing a harness and cooperating with blood sampling during the experiment so that the situation is familiar to them. The day before the experiment the goats will receive metacam IM for analgesia and reduction of inflammation.

The day before, the day of and two days after the implantation and/or nephrectomy the animals will receive NSAIDs and/or opiates for analgesia (and reduction of inflammation (NSAIDs)). During the surgeries the animals will be anesthetized and will receive mechanical ventilatory support (after intubation). After arousal from anesthesia, animal comfort will be closely monitored and extra analgesia will be administered in case of discomfort. Blood sampling will be performed on alternate days to determine plasma levels of uremic retention solutes(uremic model) and for monitoring inflammatory responses. Prior to the surgery procedures, the animals will be trained for cooperating with blood sampling so that the situation is familiar to them. Total blood draw volume will be restricted to max 8 mL/kg in two weeks.

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

See refinement and H.(Pijn en pijn bestrijding)

### Repetition and duplication

#### E. Repetition

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

As far as we know no other group in the Netherlands has tested biodegradable vascular access grafts in an uremic large animal model.

### Accommodation and care

#### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

#### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

#### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Prior to surgery adequate pain medication, after consultation with an experienced veterinarian, will be administered peri-operatively (day -1 to day +4) for analgesia and reduction of inflammation (NSAIDs). The animals will be anesthetized for the embolization/ (or surgical nephrectomy). After arousal from anesthesia, animal comfort will be closely monitored daily and extra analgesia will be administered in case of signs of discomfort.

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

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

The animals used as an uremic model may develop a postinfarction syndrome with groin pain, fever, anorexia and/ or nausea for a few days after the embolization. A complication of the angiography or embolization may occur, such as a hematoma or adjacent organ necrosis. The extent of the subtotal renal embolization (or surgical nephrectomy) may be too large, resulting in too little remaining functioning kidney tissue leading to severe symptoms due to accumulation of waste solutes and excess water, such as lethargy, anorexia, nausea, vomiting, pruritus, bleeding tendency, high blood pressure, edema, shortness of breath due to pulmonary congestion, hyperkalemia causing cardiac arrhythmias and anemia.

**Explain why these effects may emerge.**

During the implantation surgery, an incision in neck will be made to allow access to the jugular vein and carotid artery. This may lead to infections post-surgery.

Due to the increased outflow on the vein side of the anastomoses endothelial damage might occur leading to the formation of NIH. Also due to the clamping of the vessels, there is a time of ischemia and possible vessel injury might occur which both can lead to thrombosis.

With every embolization procedure (also in humans) there is a small chance that a post infarction syndrome or complications such as hematoma or adjacent organ necrosis occur<sup>4</sup>. Although we aim for a stable uremic milieu without the need for daily dialysis, the kidney injury induced by embolization (or surgery) during the development of the model may happen to be too severe. The implantation procedures will be performed by an experienced vascular surgeon. In addition, the implantation techniques will be practiced prior to the start of the experiment on anesthetized goats in a different study. This allows us to gain experience with accurately determining the approach and procedure, reducing the risk of unnecessary blood loss and reducing ischemia time. After the procedure animal comfort will be closely monitored and extra analgesia will administered if necessary. In case of severe symptoms due to inflammation or occlusion the animals will be euthanized to prevent further suffering.

The embolization (and surgical) procedures will be performed by a very experienced interventional radiologist with ample experience in nephrological angiography (and a very experienced surgeon with ample experience in nephrectomy), which minimizes the risk of procedural complications and induction of a uremic model that is too severe. In addition, the embolization and surgical nephrectomy techniques on anesthetized goats are currently being performed in a different study(approval has been obtained from the DEC). This allows us to gain experience with accurately determining the extent of the embolization/nephrectomy, reducing the risk of induction of too severe kidney failure causing severe symptoms. After the procedure animal comfort will be closely monitored and extra analgesia will administered if necessary. In case of severe symptoms due to accumulation of uremic toxins and excess water necessitating daily dialysis, the animals will be euthanized to prevent further suffering.

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

**J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Human endpoints will be reached when graft occlusion of more than 80% is perceived on both sides and in case of abnormal and/or behavior, stereotype labored breathing, unexpected significant loss of weight, untreatable infection, rough hair coat/ unkempt appearance, lethargy, neurological signs or any condition interfering with daily activities (e.g. eating or drinking, ambulation).

Indicate the likely incidence.

Studies in humans have shown that primary patency failure (short after/during surgery) for ePTFE grafts lies around 20% and that ultimately graft occlusion occurs in 50% of the implanted ePTFE graft after one year<sup>2</sup>. Due to our time point for our initial study (with ePTFE) set at a maximum of 3 months and due to the fact that we implant bilateral we estimate that 5% will meet this criteria for due to primary patency failure and 5% due to secondary failure in both grafts. So in total 10% will meet this criteria

**before the end of the study due to the graft occlusion.**

For the creation of the uremic model the likely incidence of a human endpoint is also moderate (10%), for reaching a to severe uremic condition. In combination with the surgical procedures we (maximum 5% technical failure scaffold implantation +25% nonfunctional blood flow through scaffold), we estimate a **40%** meet this criteria before the end of the study due to uremic conditions or graft failure.

#### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

##### **Level of discomfort: moderate.**

In the case of the implantation studies we expect that the animals will experience short-term moderate suffering after the surgery and from the repeated imaging procedures needed to monitor the grafts. In addition, For the repeated cannulation studies we expect that the animals will experience short-term moderate suffering due to the puncturing of the vessel.

In the case of the uremic animals we expect that the animals will experience short-term moderate suffering after the embolization (or surgical nephrectomy). We aim to induce a degree of chronic kidney failure that causes a stable uremic milieu (urea preferably  $\geq 15$  mM and creatinine preferably  $\geq 250$  uM) without the need for daily dialysis. With this degree of kidney failure the animals will experience moderate impairment of the well-being and general condition (e.g. fatigue) due to accumulation of waste solutes. (Note: the kidney injury induced by embolization (or surgery) may happen to be too severe, causing severe symptoms due to accumulation of excess water (e.g. pulmonary edema) and severe hyperkalemia ( $\geq 6.5$ mM) necessitating daily dialysis, which will severely impair the well-being of the animals. In this case the animals will be killed to prevent further suffering.)

Although we have very good experience with goats, the embolization/ nephrectomy procedure carries a risk in this species. Goats are ruminants and are susceptible to bloat, an over distention of the reticulorumen (the first two stomach chambers) with gases of fermentation, which may occur after the embolization/ nephrectomy procedure due to discomfort leading to anorexia, which causes microbial dysbiosis in the reticulorumen. Bloat is associated with a high mortality. In addition, disruption of the microbial flora caused by anorexia, will also hamper adequate ruminal fermentation (required for efficient fiber digestion) when the goats start eating again. This will also have major impact on the goats' health. Together with a very experienced veterinarian), we will make every effort to prevent these complications by applying optimal postoperative analgesia and careful monitoring of the goats. However, if -despite careful monitoring and optimal analgesia- disruption of the microbial flora occurs, we will consider to transfer ruminal fluid from healthy goats to the affected goat via a stomach tube to boost the ruminal fermentation as last rescue. If this the additional treatment is not curative we consider this as a humane end-point.

If despite all these measures the induction of chronic kidney failure in goats is accompanied by too much morbidity or mortality we have to cease the use of an uremic model and have to make do with the knowledge gained in our rat CKD model.

#### **Reference list:**

- 1: Lemson, M. S., Daemen, M. J., Kitslaar, P. J., & Tordoir, J. H. (1999). A new animal model to study intimal hyperplasia in arteriovenous fistulas. *The Journal of Surgical Research*, 85(1), 51-8. <http://doi.org/10.1006/jssr.1999.5566>
- 2: Misra, S., Gordon, J. D., Fu, A. A., Glockner, J. F., Chade, A. R., Mandrekar, J., ... Mukhopadhyay, D. (2006). The Porcine Remnant Kidney Model of Chronic Renal Insufficiency. *Journal of Surgical Research*, 135(2), 370-379. <http://doi.org/10.1016/j.jss.2006.04.001>
- 3: Eschbach JW, Adamson JW and Dennis MB: physiologic studies in nonnal and uremic sheep: I. The experimental model. *Kidney International* 1980; 18: 725-31.
- 4: Schwartz, M. J., Smith, E. B., Trost, D. W., & Vaughan, E. D. (2007). Renal artery embolization: Clinical indications and experience from over 100 cases. *BJU International*, 99(4), 881-886. <http://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06653.x>

#### **End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be killed up to 6 months after implantation and extensive work will be conducted on morphology of the scaffold using immunohistochemistry (IHC; to define cellularization in general and macrophage subtype, presence of endothelium and extracellular matrix (ECM) components) and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR)). Other relevant tissues (e.g. heart, bone marrow, kidney and carotid/jugular remnant will also be collected to assess weight, morphology and cellular infiltrate.

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

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

Yes

#### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2017.II.547.015
2. Titel van het project : In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts
3. Titel van de NTS : Creëren van nieuwe bloedvaten voor patiënten met nierfalen, doormiddel van lokale weefsel constructie
  
4. Type aanvraag:
 

nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### **5. Contactgegevens DEC**

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

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

- ontvangen door DEC: 01-06-2017  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 14-06-2017  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 21-06-2017/25-06-2017 en 10-07-2017/28-07-2017  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: Positief

#### **7. De aanvraag is afgestemd met de IVD en deze is hiermee akkoord.**

#### **8. Eventueel horen van aanvrager**

- Datum: 05-07-2017
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6
- Aanwezige (namens) aanvrager: 3
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
  - De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of het hier eigenlijk niet om twee projecten gaat. Zitten er niet twee vraagstellingen in: de toepassing en onderbouwend fundamenteel onderzoek.

*Onderzoekers zijn van mening dat het een project is, voornamelijk omdat het uiteindelijk om één product gaat. Het gaat eigenlijk om een preklinische studie; wat uit de studie komt hoopt men naar de kliniek te kunnen brengen. Daarvoor zijn nog twee fases nodig: hoe presteert de graft bij uremie en wat doet de graft mechanisch en in klinisch formaat. Tot*

*nu toe is het materiaal alleen in kleine proefdieren getest en onderzoekers willen dat nu opschalen naar grote proefdieren en kijken wat er gebeurt als het materiaal erin wordt gezet. Vervolgens willen ze die informatie graag combineren met wat er gebeurt in de conditie van uremie. Deze twee onderdelen willen onderzoekers dus combineren en met de informatie die daaruit voort komt willen onderzoekers terug naar de samenwerkingspartner om een design te creëren wat aangepast is op de mens (formaat klinisch) en de condities die de ziekte met zich meebrengt. Er zijn twee redenen om het design aan te passen: omdat het qua flow iets doet wat men niet verwacht in het grote dier of omdat het zich anders gedraagt in de ziekte.*

*Kortom er zijn twee criteria voordat het uiteindelijk in de patiënt toegepast kan worden: 1) het moet in een ziek model kunnen functioneren (rat) en 2) het mechanisme moet goed zijn (geit) voordat het naar de kliniek kan. Indien aan het einde blijkt dat het in de geit goed werkt, maar niet functioneert in uremisch model dan is dat een no go. Als onderzoekers zien dat het in het rat uremisch model niet relevant is, dan is het in het geit uremische model ook niet relevant en dus eveneens een no go.*

- *De graft is een covalente binding en geen coating. Het materiaal wordt op een manier gecreëerd zodat er als het ware 'blokjes' aangeklikt kunnen worden waarmee het onderdeel wordt van het materiaal.* Dit moet ook zo uitgelegd worden.
- De DEC vraagt zich af of het niet verstandig is dat de onderzoeker (in stap 1B en 1C) de shunt dichter naar de oppervlakte toe verplaatst omdat dat meer overeenkomt met de situatie bij de patiënt en de variatie verkleind wordt.

*In beide situaties is er sprake van een 'bocht' dus er wordt niet verwacht dat er verschil is in flow. Met name biotechnische overwegingen maken dat de shunt in de geit dieper geplaatst wordt.*

De DEC raadt de onderzoekers aan om duidelijk in de aanvraag op te nemen dat of je **nu** diep of oppervlakkig legt het voor de flow niet uitmaakt, maar in de eerste studie kiest voor diep vanwege de kwetsbaarheid en in de tweede studie kiest voor de oppervlakte vanwege de aanprijsbaarheid, met de consequentie dat de dieren solitair gehuisvest moeten worden. Dit maakt het aannemelijk dat resultaten wel vergeleken kunnen worden. Hierbij dient ook aandacht te worden besteed aan de lengte van de graft, de kromming en de manier van anastomoses leggen.

- Er is een verschil in technische uitval (is de feitelijke uitval) en drop outs omdat de geit te hoog of te laag uremisch is. 50% Uitval suggereert dat er technisch veel te verbeteren is. Dit moet duidelijk opgeschreven worden en de selectie criteria moeten worden genoemd. *Onderzoekers geven aan dat het inderdaad niet om technische uitval gaat. Ze hebben nu 2 geiten uremisch gemaakt waarvan 1 geit onvoldoende uremisch was. Deze embolisatie is in 2 stappen uitgevoerd. Bij de andere geit is de embolisatie in één stap gedaan en daarvan is de uremie net voldoende. De verwachting is dus dat de uremie eerder te mild zal zijn dan te zwaar. Een ernstige uremie is ook niet nodig voor het model. Vermoedelijk is de uitval van 50% dan ook overgewaardeerd, maar dat is lastig inschatten op basis van slechts 2 geiten.*

- De onderzoeker geeft aan alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. De ratio hiervoor is aan de magere kant. De DEC verzoekt de onderzoeker dit dan ook nader te expliciteren. Heeft het ook te maken met uitval? En hoe ziet de onderzoeker het gebruik van alleen vrouwtjes t.o.v. de translatie naar de mens? En heeft de cyclus van het vrouwtje geen invloed?  
*Vanwege huisvestingsproblemen met mannelijke geiten worden vrouwtjes gebruikt. Onderzoeker verwacht niet dat gegevens uit de vrouwelijke geit niet transleerbaar zijn naar de man, omdat de geiten niet bronstig/bokkig worden omdat er geen bok in de buurt is. De cyclus van de rat is vier dagen en dus speelt het daarbij ook geen rol. De meeste van de patiënten zijn vrouwelijke post menopauzale patiënten, waarbij oestrogeen hormonen ook geen rol meer spelen.* Dit moet worden opgenomen in de aanvraag. De huidige tekst kan worden verwijderd.
- De DEC vraagt zich af of penstympanie niet kort durend kan leiden tot ernstig ongerief. De DEC verzoekt de onderzoeker hierover contact op te nemen met de IvD en de begeleidend dierenarts voor nader overleg en het opnemen hiervan in de bijlage.  
*De penstympanie lijkt mee te vallen. Bij de 2 uremische geiten is geen penstympanie opgetreden. De kans daarop kan dan in de aanvraag worden aangepast. De DEC blijft wel bij haar standpunt dat penstympanie kortdurend tot ernstig ongerief kan leiden; het eventueel optreden daarvan moet goed gemonitord worden. De onderzoeker stelt voor om bij penstympanie het dier te behandelen, maar als dat na één of twee keer niet lukt of als het dier te veel pijn heeft dat het dier dan uit de proef gehaald.*
- In de figuur staan 4 afbeeldingen van de graft en verschillende manieren waarop die eruit zien. In het experimental design staan 5 groepen genoemd waarvan de 5<sup>e</sup> groep een mogelijke combinatie is van verschillende designs. Deze 5<sup>e</sup> optie komt niet terug in de figuur.  
*In de figuur staan combinaties van verschillende bindingsfuncionalisaties. Het is een combinatie van functionaliteiten die genoemd zijn bij B, C en D. Dit dient beter toegelicht te worden in de aanvraag inclusief het noemen van voorbeelden.*
- De keuze van de read out in de functionaliseringstudie is niet duidelijk. CD68 wordt in A (exp. aanpak) niet genoemd als primaire uitkomstparameter.  
*CD68 zegt iets over de polarisatie van marcofagen. Het is de enige marker die de onderzoekers hebben waarvan ze weten dat het materiaal daar invloed op heeft en verandert. Voor de lange termijn is het niet 'netjes' om dit als marker te nemen, maar hierdoor weten onderzoekers wel in wat voor gradiënt variatie ze moeten kijken. Op een later tijdpunt zal een andere marker gebruikt worden, veelal de morfologie. Hier dient ook iets over gezegd te worden in de aanvraag.*
- Hoe vindt de biofunctionalisering plaats?  
*Onderzoeker legt uit dat het materiaal uit verschillende lagen/materialen is opgebouwd, welke covalent gebonden zijn. In de aanvraag moet duidelijker genoemd worden wat bedoeld wordt met biofunctionalisering. Het in vitro deel gebeurt bij de samenwerkingspartner en het ex vivo en in vivo deel wordt door de onderzoekers gedaan.*

Dit moet ook duidelijk worden uitgelegd in de aanvraag.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 21-06-2017
- Datum antwoord: 25-06-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

##### Algemeen

- De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of het hier niet eigenlijk om twee projecten gaat. DE DEC denkt dat er een kans bestaat dat de CCD deze aanvraag ziet als twee aparte projecten: 1) ontwikkeling en implantatie van gefunctionaliseerde grafts in ratten en geiten en 2) implantatie en optimaliseren van grafts onder uremische condities in geiten. Daarnaast lijkt het onderzoek in twee verschillende stadia te zitten. Het uremisch model is gericht op de toepassing in de mens en het andere model is in een basaal stadium. Verder heeft de DEC moeite met begrijpen van het niet-uremische model in vergelijking met de toepasbaarheid in de mens en wat dat oplevert. Want de toepassing in de mens zal, wat de DEC ervan leest, eigenlijk alleen in een uremisch patiënt zijn. Kunt u dat niet beter sequentieel uitzoeken in plaats van parallel aan elkaar? Graag uw visie.

*In het verleden zijn soort gelijke grafts onderzocht in vivo, maar tot op heden niet in klinische relevante dimensies en positie. Wij willen daarom eerst onderzoeken wat er in vivo gebeurd als we een verbinding maken tussen een arterie en een veine met een graft die klinische afmetingen heeft. Dit is niet mogelijk in de rat vanwege het schaal verschil. De uitkomsten van deze proeven zullen waardevolle informatie opleveren over de patency, zelf helende capaciteiten en andere relevante vraagstukken.*

*Maar zoals de DEC opmerkt willen we in dit project twee vragen beantwoorden die we later combineren. De uiteindelijke toepassing zal in uremische patiënten plaats vinden. Hierdoor vinden wij het essentieel om in hetzelfde project de effecten van chronisch nierschade op weefsel regeneratie te onderzoeken en in de rat beschikken we over zo'n gevalideerd ziekte model.*

*Doordat deze proeven parallel lopen kunnen we de resultaten combineren over de klinische relevante dimensies en de effecten van CKD op weefsel regeneratie om zo een graft te ontwikkelen, die ten eerste functioneel is, maar ook afgestemd is op een omgeving met een potentieel aangetast helingsproces. Pas als we de beide effecten van een in vivo toepassing en van CKD weten kunnen we hier specifiek ons graft design en functionaliteit op aanpassen. Hier moet u denken aan specifieke cellen aantrekken, het immuun systeem remmen/verstrekken, afbraak vertragen/versnellen, etc. Dus beide proeven zijn gericht op een uiteindelijke toepassing in de mens, de één is echter mechanistisch en de ander systemisch. Maar beide zijn nodig om tot een uiteindelijk ontwerp te komen.*

*De resultaten over het functioneren in vivo situatie zullen wij dan ook terugkoppelen naar onze onderzoek partners die verantwoordelijk zijn voor het ontwerp en de ontwikkeling in*

*vitro. Hierdoor kunnen we in ons consortium gericht op zoek een graft die zo goed mogelijke is afgestemd op de klinische wensen/vereiste. Hier hopen we mee te voorkomen dat we aan het aan einde van dit project erachter komen dat de functionaliteit die in vitro is ontwikkeld, niet toepasbaar/relevant is in vivo.*

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond vs. 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over de volgorde van de experimenten. De DEC had het idee dat de rattenstudies vooraf zouden moeten gaan aan de geitstudies, tenzij er een connectie is die de DEC niet helder is. De volgorde van de experimenten is in ieder geval onvoldoende goed uitgelegd en onvoldoende navolgbaar. Graag verhelderen en eventuele go/no go momenten benoemen.

*In de geiten studies implanteren we grafts van klinische dimensies tussen een arterie en een veine. Dit is de eerste keer dat zo iets gebeurd met een graft van dit type en hierdoor verwachten we inzicht te krijgen in de in vivo effecten.*

*Het rat model is echter niet geschikt voor het creëren van een aterio veneuze verbindingen met een vergelijkbare grootte, maar hier hebben we wel de beschikking over een gevalideerd ziekte model. Dit maakt het dus geschikt om het effecten van CKD te onderzoeken.*

*De gecombineerde resultaten van deze twee proeven gebruiken we om een aangepaste graft te maken die we verder zullen testen in de rat op functionaliteit. Hiervan zullen wij het meest belovende design testen op klinische toepasbaarheid in de laatst geplande geiten proeven(aanprikelbaarheid en uremische condities).*

*Verdere verheldering aangebracht en go/no go momenten toegevoegd.*

- 3.1 Achtergrond: Figuur 2 lijkt te missen en zo niet, dan graag de nummering van de figuren aanpassen.  
*De nummering is aangepast.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Er is een discrepantie tussen figuur 3 en tekst in de beschrijving van de volgorde. Er lijken pijlen te missen in de figuur. Graag aanpassen.  
*De figuur is aangepast.*

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of het niet verstandig is dat u (stap 1B en 1C) de shunt dichter naar de oppervlakte toe verplaatst omdat dat meer overeenkomt met de situatie bij de patiënt en de variatie verkleind wordt. Graag uw visie.

*De onderzoeker snapt de redenatie van de DEC. Het is echter bij 1B, waar we beter naar de klinische translatie willen kijken, zeker de bedoeling om de graft in een huidplooï dichter bij het oppervlak te plaatsen. Hierdoor is het echter wel zo dat de dieren solitair gehuisvest moeten worden door de kwetsbaarheid van de graft zo dicht aan het oppervlak. Wij hebben er daarom voor gekozen om dit alleen in stap 1B te doen om het ongerief voor de dieren niet te vergroten.*

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij de berekening van de statistische methoden geeft u bij stap 1A aan dat er "5% technical failure scaffold implantation + 25% nonfunctional blood flow through scaffold" is. Hoe verhoudt zich dat tot implantaten bij de mens? Als de geit het optimale model is, suggereert dat dan dat in de mens ook een dergelijk percentage technical failure scaffold implantation en nonfunctional blood flow voor komt? Kunt u uitleggen wat de oorzaak is van de 25% nonfunctional blood flow?  
*Met non-functional blood flow wordt bedoeld dat het geplande eindpunt niet gehaald wordt door het falen van de graft door obstructie. Deze primarie failure ligt bij de mens(met ePTFE grafts) rond de 20%. De geit is in dit geval een ideaal model, doordat het een hogere incidentie heeft van thrombose en neo intiminal hyperplasie(ingroei van de vaatwand). Als we dit met onze grafts weten terug te dringen tot een minimum in de geit, hebben we er vertrouwen in dat dit ook bij de mens ook het geval is.*
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij de berekening van de statistische methoden geeft u bij stap 1C aan dat een 50% survival rate verwacht wordt. Dit uitvalspercentage acht de DEC erg hoog en dient nader toegelicht/geduid te worden. *Bij 1C is de survival rate van 50% te verklaren doordat het creëren van de beoogde uremische schade nauw luistert. Niet elk dier zal na de uitgevoerde nefrectomie genoeg uremisch zijn of juist te hevig. Bij de dieren waar de nier schade niet voldoende/of te hevig is zal niet worden overgegaan op implantatie. Doordat we dit meenemen in het percentage bij de survivability komen we uit op 50%.*
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij "beschrijf beoogde behandelingen", verwijst u naar de voorgaande tekst. De DEC verzoekt u hier gewoon puntsgewijs en kort de handelingen te beschrijven of weer te geven in model/figuur.  
*Aangepast naar advies van de DEC.*
- B. De dieren: U geeft aan 10% extra dieren voor uitval te rekenen. De DEC vindt dat niet acceptabel gezien het feit dat u al voldoende compenseert voor uitval. Graag uit de aanvraag verwijderen of nader motiveren.  
*Aangepast naar advies van de DEC.*
- B. De dieren: U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. De ratio hiervoor is aan de magere kant. De DEC verzoekt u dit dan ook nader te expliciteren. Heeft het ook te maken met uitval? En hoe ziet u het gebruik van alleen vrouwtjes t.o.v. de translatie naar de mens? En heeft de cyclus van het vrouwtje geen invloed?  
*De belangrijkste reden blijft dat het onderzoek te goede komt, doordat ze vele malen makkelijker te trainen zijn en rustiger dan hun mannelijke soortgenoten. De nek van de dieren na implantatie zal een kwetsbare plek blijven en we willen de dieren voor het grootste gedeelte toch in groepen huisvesten, mannetjes zullen meer fysiek contact aangaan wat potentieel schadelijk kan zijn voor de geimplanteerde graft. Voor de translatie naar de mens dient er zeker rekening gehouden te worden met de cyclus van vrouwelijk dieren. Het is echter wel zo dat er per jaar meer vrouwen worden gediagnosticeerd met nierziekte dan mannen. Ook is er bekend dat estrogenen een positieve werking hebben op weefsel*

*regeneratie en zal dus kunnen bijdragen aan het blootleggen van de effecten van in situ TE die wij willen onderzoeken.*

- K. Classificatie van ongerief: De DEC vraagt zich af of penstympanie niet kort durend kan leiden tot ernstig ongerief. De DEC verzoekt u hierover contact op te nemen met de IVD en de begeleidend dierenarts voor nader overleg en het opnemen hiervan in de bijlage. *Na overleg met de IVD de zin: "Although we have very good experience... Together with a very experienced veterinarian... make every effort to prevent these complications.... analgesia and careful monitoring of the goats" van A. Experimentele aanpak toegevoegd aan het kopje K. Classificatie van ongerief. Juist door deze maatregelen zijn wij van mening dat we voorkomen dat ernstig ongerief ontstaat en is de classificatie "ernstig ongerief" niet van toepassing.*

## Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U zegt: "*This will allow us to validate the workflow and additionally double check the importance of a promising functionalization candidate in a second kidney disease model.*" Dit wekt de suggestie dat u ook een ander niermodel gaat toepassen. Dit dient nader toegelicht te worden of anders geformuleerd te worden.  
*Aangepast naar advies van de DEC. Met dit tweede model werd de geit bedoeld.*
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC zou graag meer inzicht krijgen in de studies naar functionalisering van de graft. Hoeveel dieren gebruikt u? Hoeveel coatings past u toe, en op basis waarvan en wanneer? Zitten daar go/no-go in? Dit is onvoldoende duidelijk.  
*Doordat de functionaliteit covalent gebonden is aan het materiaal is geen sprake van coatings. De juiste verhoudingen van functionaliteit/origineel materiaal wordt met in vitro testen onderzocht door onze consortia partners. In combinatie met de informatie verkregen uit de eerder in vivo studies zal een zo goed mogelijk design worden gekozen voor de in vivo studies.*
- B. De dieren: U vraagt 50 dieren aan voor training, dat is 10% van het totaal. De DEC acht dit aan de hoge kant, te meer omdat u in de aanvraag noemt dat er gebruik wordt gemaakt van zeer ervaren chirurgen. Dit lijkt een discrepantie. Graag nader motiveren/aanpassen.  
*Aangepast op advies van de DEC naar minder dieren.*
- B. De dieren: U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. De ratio hiervoor is aan de magere kant. De DEC verzoekt u dit dan ook nader te expliciteren. Heeft het ook te maken met uitval? En hoe ziet u het gebruik van alleen vrouwtjes t.o.v. de translatie naar de mens? En heeft de cyclus van het vrouwtje geen invloed?  
*De voornaamste reden blijft het bereiken van een groei plateau bij vrouwtjes. In de beginstadia is de graft niet in staat om mee te groeien, waardoor er extra strain kan komen te staan op de graft en aanhechtingen. Daarnaast weten we uit voorgaand onderzoek dat het CKD model minder heftig is in vrouwelijk dieren, wat ze in staat stelt om het eindpunt*

*van 5 maanden post-implantatie te bereiken. Dit verlaagt ook de kans dat we dieren vroegtijdig uit proef moeten halen.*

*Voor de translatie naar de mens dient er zeker rekening gehouden te worden met de cyclus van vrouwelijk dieren. Het is echter wel zo dat er per jaar meer vrouwen worden gediagnosticeerd met nierziekte dan mannen. Ook is er bekend dat estrogenen een positieve werking hebben op weefsel regeneratie en zal dus kunnen bijdragen aan het blootleggen van de effecten van in situ TE die wij willen onderzoeken.*

- B. De dieren: Het experimental design past niet bij figuur 1 in deze bijlage, want in het experimental design worden andere onderdelen genoemd dan in de figuur. Dit dient uitgelegd dan wel aangepast te worden.

*Tot mijn spijt kan ik niet terug vinden wat de DEC hiermee bedoelt, Figuur 1 is voor de verheldering van de verschillende mogelijkheden tot aanpassen van de graft naar functionaliteit, welke in de tekst worden beschreven.*

- B. De dieren: De keuze van de read out in de functionaliseringstudie is niet duidelijk. CD68 wordt in A (exp. aanpak) niet genoemd als primaire uitkomstparameter.

*CD68 is inderdaad geen primaire uitkomstparameter, waar dit een mate is voor macrofaag polarisatie, wat voornamelijk te observeren in eerste periode na implantatie(eerste 2 weken). Doordat de voorgaande studies met dit materiaal korte studies waren met de focus op het immuunsysteem en circulerende cellen, weten we alleen hiervan wat de verandering in materiaal voor effect heeft op het immuunsysteem. Waar het wel zo is dat het immuunsysteem een belangrijke rol vervult in weefsel regeneratie, zien wij de variatie in deze experimenten als voorspellende waarde voor onze lange termijn experimenten in de rat.*

- H. Pijn en pijnbestrijding: De DEC vraagt zich af of buprenorfine geen effect heeft op de bloeddruk en daarmee op de shunt? De DEC verzoekt u hierover contact op te nemen met de IVD om dit nader te bespreken.

*Na overleg met de IVD Aangepast naar: "adequate peri-operatieve pijnstilling op advies van een ervaren dierenarts wordt toegepast waarbij ongewenste effecten op de bloeddruk en shunt worden voorkomen". Dit wordt in detail vastgelegd in het werkprotocol en geverifieerd en geautoriseerd door de IVD.*

- Datum vragen: 10-07-2017 (n.a.v. gesprek met de DEC d.d. 05-07-2017)
- Datum antwoord: 28-07-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
  - De DEC verzoekt u nog duidelijker aan te geven waarom dit één projectvoorstel is en niet twee. De DEC raadt u aan hierbij te betrekken de twee aspecten: 1) dat het gaat om mechanistisch onderzoek (de flow, de grootte, etc.) en 2) het onderzoeken van hoe de graft presteert onder de conditie van uremie. Hierbij dienen ook duidelijk de go/no go momenten (bv in de figuur) genoemd te worden. Een en ander zou ook duidelijker worden indien de nummering, de pijlen en de begeleidende tekst in de figuur aangepast worden.

*Indeling van figuur aangepast op aanbevelen van de DEC. No go momenten ingevoegd in het figuur en verwijzingen in de tekst. Extra beschrijving van de correlatie tussen het ziekte model en het klinisch dimensie model aangebracht om duidelijk te maken dat het om 2 proeven zijn die elkaar aanvullen en beide essentieel zijn voor een uiteindelijk klinisch relevant eindproduct.*

- Met betrekking tot de locatie van de shunt raadt de DEC u aan om nog toe te lichten waarom de shunt de ene keer diep en de andere keer aan de oppervlakte wordt geplaatst. Hierbij dient ook aandacht te worden besteedt aan de flow, de lengte van de graft, de kromming en de manier van anastomoses leggen.  
*Ligging van de shunt extra geargumenteerd met toevoeging van extra toelichting op de implantatie procedure.*
- Er is een verschil in technische uitval (is de feitelijke uitval) en drop outs omdat de geit te hoog of te laag uremisch is. 50% Uitval suggereert dat er technisch veel te verbeteren is. Graag verduidelijken of het hier gaat om uitval of drop outs en tevens de selectie criteria hiervoor noemen.

*Aangepast dat het hier om drop-out gaat hiervoor de selectie criteria bijgevoegd.*

- U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. De DEC is nog niet helemaal tevreden met de gegeven motivatie. Graag nogmaals uw motivatie en tevens graag toelichten hoe u het gebruik van alleen vrouwtjes ziet t.o.v. de translatie naar de mens en of de cyclus van vrouwtjes geen invloed heeft.  
*Toegevoegd dat vrouwelijke geiten niet in cyclus gaan bij afwezigheid van mannetjes en dat mannetjes teveel fysiek contact aangaan om in groepen te kunnen huisvesten.*
- De DEC verzoekt u een inschatting te maken van de kans op penstympanie, aan te geven wat er wordt gedaan aan monitoring, aan te geven dat bij eventueel optreden hiervan kortdurend ernstig ongerief optreedt en wat de humane eindpunten hierbij zijn.  
*Monitoring en eventuele behandelingen zijn toegevoegd. Humane eindpunten verder aangescherpt.*
- De DEC raadt u aan om bij figuur 1 in bijlage 2, duidelijker toe te lichten dat het gaat om combinaties van verschillende functionalisaties en hierbij ook enkele voorbeelden te noemen.

*Aangepast naar aanbevelingen van de DEC.*

- Graag de keuze voor CD68 als read out in de functionaliseringstudie nogmaals helder motiveren, aangeven dat op termijn een andere marker gebruikt zal worden en deze marker kort toelichten.

*Aangepast naar aanbevelingen van de DEC. Markers voor endotheel gladde spiercellen als markers voor succesvolle in situ tissue engineering in latere tijdpunten.*

- De DEC verzoekt u nogmaals helder uit te leggen wat met biofunctionalisering precies wordt bedoeld, hoe de biofunctionalisering plaatsvindt, en of dit ex vivo of in vivo plaatsvindt.

*Extra toelichting toegevoegd, proces van koppeling van de functionalisatie beschreven.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### **10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)**

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

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

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

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

Patiënten met nierfalen hebben hemodialyse nodig om de nierziekte te behandelen. Als gevolg van het frequente dialiseren raken de bloedvaten van patiënten met nierfalen beschadigd en wordt het betreffende deel van het bloedvat vervangen door een graft. De huidige grafts hebben echter als nadeel dat zij bestaan uit een materiaal dat leidt tot een hoge incidentie van trombose en infecties als gevolg van een gebrek aan zelfhelende eigenschappen in combinatie met de blijvende schade vanwege het vele aanprikkken van de graft. Om die reden wordt er gezocht naar een alternatieve graft. Onderzoekers willen nu, door middel van In situ Tissue Engineering (in situ TE), beschikbare, biologisch afbreekbare, synthetische, poreuze bilayer AV-grafts ontwikkelen die in vivo geleidelijk veranderen in levende, vasculaire grafts met een verbeterde lange termijn functionaliteit. De grafts worden, door een samenwerkingspartner, bekleed met elastomeer materiaal (STE), dat uit verschillende lagen/materialen is opgebouwd welke covalent gebonden zijn, en waarvan de lumenlaag zal worden gefunctionaliseerd om weefselspecifieke cellen aan te trekken.

Het voorliggende projectvoorstel is een preklinische studie; wat uit de studie komt hoopt men naar de kliniek te kunnen brengen. Daarvoor zijn nog twee onderzoeksfasen nodig: 1) hoe presteert de graft bij uremie en 2) wat doet de graft mechanistisch en in klinisch formaat. Tot nu toe is het materiaal alleen in kleine proefdieren getest en onderzoekers willen dat nu opschalen naar grote proefdieren en kijken wat er gebeurt als de graft erin wordt gezet. Vervolgens willen onderzoekers die informatie graag combineren met wat er gebeurt in de conditie van uremie. Deze twee onderdelen zullen vervolgens gecombineerd worden en met de informatie die daaruit voort komt willen onderzoekers terug naar de samenwerkingspartner om een design te creëren dat aangepast is op de mens (formaat klinisch) en de condities die de ziekte met zich meebrengt. Er zijn twee redenen om het design aan te passen: 1) omdat het qua flow iets doet wat men niet verwacht in het grote dier of 2) omdat het zich anders gedraagt in de ziekte.

De voorgestelde experimenten zijn naar de mening van de DEC logisch en helder opgeschreven en beargumenteerd, en ze zijn nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt met duidelijke uitkomstparameters. Gezien bovenstaande is de DEC van oordeel dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 4B uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het creëren van *in situ* TE AV-grafts, deze testen op veiligheid en werkzaamheid en indien nodig optimaliseren.  
Hiertoe zijn een viertal subdoelen geformuleerd: 1) Het evalueren van de werkzaamheid en de veiligheid van nieuwe eletrospun supramoleculaire thermoplastische elastomeren (STE) en informatie verzamelen over het gedrag van de grafts in een *in vivo* omgeving die de menselijke situatie benadert, 2) de invloed van CKD (chronic kidney disease) op weefsel regeneratie (early tissue outcome) na het implanteren van de graft onderzoeken, 3) het proces van weefselvorming over de tijd bepalen en de invloeden van functionalisatie van de graft *in vivo* onderzoeken en 4) het effect van herhaald aanprikkken op het *in situ* TE proces en de doorgankelijkheid van de grafts onderzoeken.  
Het uiteindelijke doel van het project is het toepassen van een eenvoudig beschikbare, biologisch afbreekbare, synthetische, poreuze, AV-graft welke *in vivo* geleidelijk verandert in een levend, zelfhelend vasculair transplantaat met verbeterde lange termijn functionaliteit in patiënten met nierfalen.  
Het testen van de AV-grafts op werkzaamheid en veiligheid in een ratten- en geitenmodel en het optimaliseren van de grafts zijn de laatste stappen die nodig zijn om het naar de kliniek te brengen. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep (dialyse patiënten) en het onderzoeksgebied. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. Voor de doelgroep/patiënt geldt dat hun welzijn bevorderd wordt. Indien er een graft ontwikkeld wordt die *in vivo* geleidelijk verandert in een regenererend vasculair transplantaat met verbeterde lange termijn functionaliteit, dan zullen patiënten in de toekomst minder vaak interventies voor een nieuwe een nieuwe graft te hoeven ondergaan en zullen trombose en infecties minder vaak optreden. Dit heeft een groot effect op

de kwaliteit van leven en de gezondheid van de patiënt. Voor de onderzoekers geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De onderzoeks groep heeft ervaring op het gebied van dierexperimenteel onderzoek op het gebied van uremiemodellen bij de geit. Ook hebben zij ervaring in het uitvoeren van de chirurgische ingreep voor het induceren van CKD bij knaagdieren. Het supramoleculaire elastomeer materiaal (STE) is ontwikkeld door een samenwerkingspartner. Samen met deze partner zal de graft, indien nodig, geoptimaliseerd worden. Om deze redenen is de DEC ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Zoals bij C1 reeds aangegeven bestaat het project uit twee aspecten: 1) het gaat om mechanistisch onderzoek van de graft (de flow, de grootte, etc.) en 2) het onderzoeken van hoe de graft presteert onder de conditie van uremie. Om dit te onderzoeken zijn 2 bijlagen (1 = de geit, 2 = de rat) opgesteld, welke deels parallel worden uitgevoerd.  
Met de eerste parallelle studies in de rat (1A) en de geit (1B) proberen onderzoekers de twee fundamentele vragen beantwoord te krijgen: 1) hoe functioneert de graft onder uremische condities (rat CKD model) en 2) hoe functioneert de graft in een klinisch relevant formaat (geit Bilateraal-AV model). Aan de hand van de uitkomst van beide experimenten en aanvullend *in vitro* onderzoek, zal de graft aangepast worden naar een maximaal functionele graft voor uremische patiënten. Vervolgens zal het verbeterde ontwerp, met verschillende functionalisaties, worden getest in een rat AA model (studie 2). Met de uitkomst van deze studie zal een uiteindelijk design van de graft worden vervaardigd. In het Bilateraal-AV geitenmodel zal de uiteindelijke graft vervolgens geïmplanteerd worden in de hals en herhaaldelijk worden aangepakt (studie 3). De laatste stap, voordat de translatie naar de kliniek kan worden gemaakt, is het testen van de graft in de geit onder uremische condities (studie 4). Voor het uremisch maken van de geiten wordt door de onderzoeksgroep momenteel een nieuw, minder invasief model opgezet, welke onderzoekers hopen te gebruiken in studie 4 van dit project. Helder is dat onderzoekers starten met *in vitro* onderzoek, overgaan naar *in vivo* onderzoek, aan de hand van

de resultaten de graft optimaliseren, eerst *in vitro* testen verrichten om vervolgens weer *in vivo* onderzoek te doen.

Er is met behulp van een figuur duidelijk toegelicht hoe de strategie eruitziet en welke go/no go momenten (na 1A+1B, 2 en 3) zijn opgenomen. De logische samenhang tussen de verschillende onderzoeks vragen/bijlagen en de fasering van de experimenten is in de projectaanvraag helder uiteengezet.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. De 16 geiten in de "Repeated puncture vascular access" groep (3) worden na de chirurgische ingreep solitair gehuisvest om te voorkomen dat de graft beschadigd raakt. In deze groep is de graft kwetsbaarder omdat de graft dicht aan de oppervlakte geplaatst wordt.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is in beide bijlagen matig. De DEC is van mening dat dit realistisch is ingeschat en geklassificeerd. In bijlage 1 zullen de dieren in de implantatie studie (1B) matig ongerief ervaren als gevolg van de operatie en de herhaalde beeldvormingsprocedures die nodig zijn om de grafts te controleren. In de studie 3 komt daar het ongerief van het herhaaldelijk aanprikkken van de graft en het solitair huisvesten van de dieren nog bij. Bij de uremische studie (4) zullen de dieren matig ongerief ervaring als gevolg van de operatie (embolisatie) en de gevolgen daarvan (ontstaan uremie en eventuele bijeffecten). Het is mogelijk dat er bij de geiten penstympanie optreedt als gevolg van de embolisatie. De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd, ook met de onderzoeker, over de vraag of penstympanie als humaan eindpunt moet worden beschouwd. De DEC is van mening dat penstympanie ernstig ongerief geeft, maar dat het in eerste instantie niet nodig is het dier uit het experiment te halen omdat penstympanie goed te behandelen is. De dieren zullen nauw gemonitord worden na de operatie om eventuele penstympanie tijdig vast te stellen. Indien penstympanie optreedt, dan zal het dier, in overleg met een veterinaire, behandeld worden.

Indien dit geen effect heeft of penstympanie opnieuw optreedt zal het dier uit de proef worden genomen.

In bijlage 2 is het cumulatieve ongerief matig als gevolg van maximaal twee operaties: het induceren van de uremie (en de gevolgen daarvan, zoals verlamming van de achterpoten) of de shamoperatie en het implanteren van de graft. De sham dieren die geëxcludeerd worden voor of tijdens implantatie van de scaffold, worden onder anesthesie gedood en ervaren licht ongerief. Voor het overige kunnen de dieren nog licht ongerief ervaren als gevolg van enkele metingen (bloeddruk, meten ureum gehalte in het bloed).

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door het implanteren van de graft en (voor een deel van de dieren) het toebrengen van de uremie.
13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Men houdt er in bijlage 1 rekening mee dat 10% van de dieren (in studie 1B en 3) het humaan eindpunt bereikt ten gevolge van occlusie van de graft. In studie 4 houdt men er rekening mee dat eveneens 10% van de dieren het humane eindpunt bereikt als gevolg van complicaties van de uremie of het falen van de graft. Naast het humane eindpunt zullen dieren ook uitvallen als gevolg van technische uitval. In studie 4 wordt 5% technische uitval verwacht als gevolg van het falen van het inbrengen van de graft en 25% uitval als gevolg van een niet-functieele bloeddoorstroom van de graft.  
In bijlage 2 wordt verwacht dat ongeveer 45% van de CKD dieren en 25% van de sham dieren het einde van het experiment niet haalt. Voor de CDK dieren is dit percentage als volgt opgesplitst in 10% uitval als gevolg van het behalen van het humane eindpunt (CKD gerelateerd ongerief zoals verlamming van de achterpoten) De overige 35% technische uitval is het gevolg van het technische falen van de nefrectomie (5%), het technisch falen van het inbrengen van de graft (5%) en als gevolg van een niet-functieele bloeddoorstroom van de graft (25%). Voor de sham dieren wordt geen humaan eindpunt verwacht, alleen technische uitval, welke is opgesplitst in: 5% als gevolg van het technisch falen van het inbrengen van de graft en 20% als gevolg van een niet-functieele bloeddoorstroom van de graft.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voorafgaand en tijdens het experiment vindt uitgebreid *in vitro* onderzoek plaats om de werkzaamheid, biocompatibiliteit en mechanische sterkte van de graft te valideren. De deels nog op te helderen interacties tussen cellen, weefsels en organen die effect hebben op de werkzaamheid van de graft – en het mogelijke effect van uremie op *in situ* TE – zijn dusdanig complex, dat deze niet volledig *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden waar mogelijk statistische methoden toegepast. Voor studie 4 in bijlage 1 is het aantal benodigde dieren gebaseerd op de uitkomst en validatie van het uremie model, dat momenteel wordt opgezet. In bijlage 2 worden ook dieren aangevraagd voor het trainen van chirurgen ten behoeve van het uitvoeren van de nefrectomie en het implanteren van de graft. Het aantal dieren dat hiervoor wordt aangevraagd is gebaseerd op een vergelijkbare voorgaande training en ervaring over de gemiddelde duur van een training. Onnodig proefdiergebruik wordt verder nog voorkomen doordat in bijlage 1 de grafts bilateraal geïmplanteerd worden, in bijlage 2 met behulp van verschillende metingen zoveel mogelijk informatie per dier wordt verkregen, de chirurgen getraind worden in het uitvoeren van de nefrectomie om uitval als gevolg van technisch falen te verminderen en door het toepassen van heldere go/no-go momenten.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeks groep heeft reeds ervaring met de uit te voeren experimentele handelingen en dit zal nog verder verfijnd worden door het trainen van de chirurgen in het uitvoeren van de nefrectomie. De dieren worden nauwlettend geobserveerd, zodat tijdig geconstateerd wordt wanneer een dier het humaan eindpunt bereikt, en een eventuele penstympanie snel behandeld wordt. Verder zal er adequate pijnstilling worden toegepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Er zullen in bijlage 1 alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden, omdat mannelijke geiten lastig hanteerbaar en te huisvesten zijn. Daarbij zullen de vrouwtjes niet ovuleren zolang er geen mannelijke geiten in de buurt zijn. Het toevoegen van mannelijke geiten zal er derhalve toe leiden dat de cyclus van vrouwelijke geiten van invloed kan zijn op de resultaten van de experimenten. Een laatste argument is dat mannelijke geiten meer fysiek van aard zijn. De hals van de dieren zal na implantatie een kwetsbare plek blijven en onderzoekers willen de (meeste) dieren in groepen huisvesten. Mannetjes zullen meer fysiek contact aangaan wat potentieel schadelijk kan zijn voor de geïmplanteerde graft.  
In bijlage 2 zullen eveneens alleen vrouwelijke dieren worden gebruikt. Vrouwelijke ratten hebben na 4 maanden een gewicht van ca. 300 gram bereikt en groeien dan niet meer verder. Dit is van belang omdat de graft in het beginstadium niet in staat is om mee te groeien, waardoor er extra spanning kan komen te staan op de graft en de aanhechtingen. Daarnaast is uit voorgaand onderzoek bekend dat het CKD rattenmodel minder heftig is in vrouwelijk ratten, wat ze in staat stelt om het eindpunt van 5 maanden post-implantatie te bereiken. Dit verlaagt de kans dat de dieren vroegtijdig uit proef gehaald moeten worden.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden wanneer de graft morfologisch onderzocht wordt met behulp van immunohistochemie. Daarnaast worden de overige relevante weefsels, zoals het hart, beenmerg, nieren en aorta verzameld voor post mortem onderzoek. Longitudinale, terminale en post mortem metingen kunnen het verband tussen de morfologie van de graft en de expressieprofielen in CKD versus de controledieren met en zonder functionalisatie van de graft inzichtelijk maken. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

#### *NTS*

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

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

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het creëren van *in situ* TE AV-grafts, deze testen op veiligheid en werkzaamheid en indien nodig optimaliseren, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig en mogelijk kortdurend ernstig ongerief.  
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan kan dit project er op korte termijn toe bijdragen dat een er *in situ* TE AV-graft ontwikkeld wordt dat vele malen langer mee gaat dan de huidige synthetische grafts, doordat het herstellend vermogen heeft en niet snel verstopt of geïnfecteerd raakt. Dit heeft een positieve invloed op de kwaliteit van leven van patiënten met nierfalen; patiënten die toch al veel lijden als gevolg van hun aandoening. De DEC kent hier veel gewicht aan toe. Maar ook andere patiënten, bij wie vervanging van het bloedvat gewenst is, zijn gebaat bij de ontwikkeling van deze graft. De DEC is derhalve van mening dat de graft een grote toepasbaarheid zal hebben. Ook hier kent de DEC veel gewicht aan toe. Het is aannemelijk dat de deels fundamentele, deels translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de onderzoekers en voor de samenwerkingspartner van belang kan zijn om aansprekende

onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het creëren van *in situ* TE AV-grafts, welke geschikt zijn voor patiënten met nierfalen een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **E. Advies**

##### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden. Indien bij één of meerdere geiten penstympanie is opgetreden, dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:....
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:....
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:....

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

##### 3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT

[Barcode]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[centralecommissiedierproeven.nl](http://centralecommissiedierproeven.nl)  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
**AVD1150020173344**  
**Bijlagen**  
**2**

Datum 7 september 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 september 2017. Het gaat om uw project "In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020173344. 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 opgeschorst. 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:**

7 september 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020173344

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
7 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173344

### **Gegevens aanvrager**

#### **Uw gegevens**

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

#### **Gegevens verantwoordelijke onderzoeker**

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD student  
Afdeling: Nephrology & Hypertension  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

Post doc

Afdeling:

Nephrology &amp; Hypertension

Telefoonnummer:

[REDACTED]

E-mailadres:

[REDACTED]

**Datum:**

7 september 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020173344

**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 oktober 2017

Geplande einddatum:

1 oktober 2022

Titel project:

In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts

Titel niet-technische samenvatting:

Weefselconstrucie van bloedvaten voor patienten met nierfalen

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500, 508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- [x] Projectvoorstel
- [x] Beschrijving Dierproeven
- [x] Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

6 september 2017



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD1150020173344  
Bijlagen  
2

Datum 7 september 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

### Factuur

Factuurdatum: 7 september 2017  
Vervaldatum: 7 oktober 2017  
Factuurnummer: 173344  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020173344	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT  
[Barcode]

**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  
AVD1150020173344

Datum 22 september 2017  
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 6 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts" met aanvraagnummer AVD1150020173344. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Welke informatie nog nodig**

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

#### **Niet technische samenvatting**

U beschrijft de doelstelling van het testen van de grafts in gezonde en zieke dieren, maar de andere subdoelstelling van het testen van de grafts in klinisch formaat wordt hierbij niet benoemd. Graag dit aanvullen.

#### **Onduidelijkheden**

- Bijlage 3.4.4.1 beschrijft meerdere modellen in de geit die veel van elkaar verschillen in handelingen. Graag deze bijlage splitsen in een bijlage voor 1) AV-model en repeated puncture vascular access en 2) bijlage voor het Uremic goat model. Voor deze extra bijlage zullen de leges met 254 euro verhoogd worden. Voor deze verhoging is een extra factuur verstuurd aan uw financiële afdeling.

- Kunt u bij vraag B van bijlage 3.4.4.1 de herkomst van de geiten benoemen?

- In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u dat de dieren voor de repeated puncture

**vascular access studie individueel worden gehuisvest. Graag dit bij vraag F benoemen aangezien dit afwijkt van wat is beschreven in de EU richtlijn.**

**Datum:**  
22 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173344

- Bij de berekeningen van het benodigd aantal dieren houdt u rekening met uitval van dieren. Bijvoorbeeld bij bijlage 3.4.4.2 rat CKD experiments berekent u een benodigd aantal dieren van 37 voor CKD-ratten. Wanneer 37 dieren worden ingezet en een uitval van 45% wordt verwacht, resulteert dit in 20.35 bruikbare dieren (=37\*.55) in plaats van de benodigde 25 dieren. Om te voorkomen dat u te weinig dieren inzet in uw studies raden wij u aan de berekeningen van alle dieraantallen in beide bijlagen nogmaals te controleren en indien nodig aan te passen.

- Voor het uremic goat model (bijlage 3.4.4.1) beschrijft u 50% uitval, en gebruik van 12 dieren per groep. U beschrijft 2 groepen nodig te hebben. Is het aantal van 24 dieren dan correct, of zou dit 48 dieren moeten zijn?

- In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u dat een deel van de dieren mogelijk licht of terminaal ongerief zal ondergaan. Kunt u het te verwachten ongerief in een tabel weergeven en opsplitsen in terminaal/licht/matig?

- In bijlage 3.4.4.2 heeft u het laatste deel van vraag L niet ingevuld. Graag dit alsnog invullen.

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

#### **Opsturen binnen veertien dagen**

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

#### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

#### **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).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen

Datum:  
22 september 2017  
Aanvraagnummer:  
AVD1150020173344



Datum 2 oktober 2017  
 Betreft Vervolg aanvraag AVD115002017334

Divisie Interne Geneeskunde en  
 Dermatologie

Nefro Vasculaire  
 Geneeskunde

[REDACTED]  
 PhD student

Beste leden van de CCD,

Met onderstaande overzicht heb ik getracht afdoende antwoord gegeven te hebben op uw vragen en opmerkingen. Wijzigingen aan de hand van het commentaar van de zijn CCD zijn aangebracht in de aanvraag en blauw gemarkeerd.

#### **Niet technische samenvatting**

Aangevuld na opmerking van de CCD

**Bijlage 3.4.4.1 beschrijft meerdere modellen in de geit die veel van elkaar verschillen in handelingen. Graag deze bijlage splitsen in een bijlage voor 1) AV-model en repeated puncture vascular access en 2) bijlage voor het Uremic goat model.**

Aangepast na opmerking van de CCD. Bijlage gesplitst en uremisch geit model los beschreven.

#### **Kunt u bij vraag B van bijlage 3.4.4.1 de herkomst van de geiten benoemen?**

Aangevuld na opmerking van de CCD. Hier echter wel de naam van de commerciële boerderij wegelaten vanwege mogelijke inbreuk op privacy.

**In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u dat de dieren voor de repeated puncture vascular access studie individueel worden gehuisvest. Graag dit bij vraag F benoemen aangezien dit afwijkt van wat is beschreven in de EU richtlijn.**

Aangevuld na opmerking van de CCD.

Bezoekadres:  
 Heidelberglaan 100  
 3584 CX Utrecht

Postadres:  
 Huispostnummer 100  
 Kamernummer 100  
 Postbus 85500  
 3508 GA Utrecht

**Bij de berekeningen van het benodigd aantal dieren houdt u rekening met uitval van dieren. Bijvoorbeeld bij bijlage 3.4.4.2 rat CKD experiments berekent u een benodigd aantal dieren van 37 voor CKD-ratten. Wanneer 37 dieren worden**



ingezet en een uitval van 45% wordt verwacht, resulteert dit in 20.35 bruikbare dieren (= $37 \times .55$ ) in plaats van de benodigde 25 dieren. Om te voorkomen dat u te weinig dieren inzet in uw studies raden wij u aan de berekeningen van alle dieraantallen in beide bijlagen nogmaals te controleren indien nodig aan te passen.

Aangepast na opmerking van de CCD. Berekeningen nu zo doorgerekend zoals aangegeven door de CCD. Wijzigingen in het aantal dieren aangepast in de rest van de aanvraag.

**Voor het uremic goat model (bijlage 3.4.4.1) beschrijft u 50% uitval, en gebruik van 12 dieren per groep. U beschrijft 2 groepen nodig te hebben. Is het aantal van 24 dieren dan correct, of zou dit 48 dieren moeten zijn?**

Dit had inderdaad 48 dieren moeten zijn. Aangepast naar commentaar van de DEC

**In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u dat een deel van de dieren mogelijk licht of terminaal ongerief zal ondergaan. Kunt u het te verwachten ongerief in een tabel weergeven en opsplitsen in terminaal/licht/matig?**

Tabel toegevoegd

**In bijlage 3.4.4.2 heeft u het laatste deel van vraag L niet ingevuld. Graag dit als nog invullen.**

Aangevuld na opmerking van de CCD

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
PhD student

**From:** Info-zbo  
**To:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
**Subject:** Aanhouden AVD1150020173344  
**Date:** donderdag 26 oktober 2017 9:45:08

---

Geachte [REDACTED]

Op 06-09-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts" met aanvraagnummer AVD1150020173344.

De CCD heeft uw aanvraag besproken. De antwoorden op de door de CCD gestelde vragen zijn bij deze besprekking betrokken. De CCD is voornemens uw aanvraag te vergunnen. Wij vragen u echter nog om, voor de volledigheid, bij bijlage 3.4.4.3 het tweede deel van vraag H in te vullen.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]  
[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)



**Datum** 26 oktober 2017  
**Betreft** Vervolg aanvraag AVD115002017334

Beste leden van de CCD,

Voor de volledigheid, is bij bijlage 3.4.4.3 het tweede deel van vraag H ingevuld.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
PhD student



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT

[REDACTED]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[centralecommissiedierproeven.nl](http://centralecommissiedierproeven.nl)  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**30 OKT. 2017**

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
**AVD1150020173344**  
**Bijlagen**  
1

Datum 27 oktober 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 6 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts" met aanvraagnummer AVD1150020173344. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 27 oktober 2017 tot en met 1 oktober 2022.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### *Aanvullende opmerkingen*

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 7 september 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:  
27 oktober 2017  
Aanvraagnummer:  
AVD1150020173344

**Nadere vragen aanvrager**

Op 22 september 2017 en 26 oktober 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op een splitsing van het geit AV-model en Uremic goat model in afzonderlijke bijlagen, herkomst van de gelten, berekeningen dieraantallen, ongeriefsinschatting en kleine aanpassingen ter completering van de aanvraag. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Overwegingen**

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. De DEC adviseerde een voorwaarde toe te voegen dat indien bij één of meerdere gelten penstympanie is opgetreden, een beoordeling achteraf dient te worden aangeleverd. Penstympanie wordt door ons gezien als complicatie die niet per definitie wordt veroorzaakt door de handelingen en daarom wordt beoordeling achteraf niet gevraagd voor deze vergunning.

**Bezoaar**

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 waar tegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezoaar 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).

**Datum:**  
27 oktober 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173344

**Centrale Commissie Dierproeven**  
namens deze:



**Algemeen Secretaris**

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 27 oktober 2017 tot en met 1 oktober 2022, voor het project "In Situ Tissue Engineering of Vascular Access Grafts" met aanvraagnummer AVD1150020173344, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 september 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 4 oktober 2017;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in an large animal model, zoals ontvangen op 4 oktober 2017;
    - 3.4.4.2 Designing optimal TE vascular grafts in the rat, zoals ontvangen op 4 oktober 2017;
    - 3.4.4.3 In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in a uremic large animal model, zoals ontvangen op 27 oktober 2017;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 4 oktober 2017;
  - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 7 september 2017
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 oktober 2017, 26 oktober 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
<b>3.4.4.1 In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in an large animal model</b>			
	Geiten (Capra aegagrus hircus)	73	Matig
<b>3.4.4.2 Designing optimal TE vascular grafts in the rat</b>			
	Ratten (Rattus norvegicus)	580	Matig
<b>3.4.4.3 In vivo testing of an electro spun vascular access graft under clinical conditions in a uremic large animal model</b>			
	Geiten (Capra aegagrus hircus)	48	Matig

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020173344

***Ter informatie***

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:  
AVD1150020173344

## 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 elnd 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:**  
AVD1150020173344

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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijssysteem, 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.