



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, of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

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 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3
 Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1
 Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

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

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen			
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Prof. dr.	Voorletters H.	Achternaam Van Krieken	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
E-mailadres contactpersoon				
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
E-mailadres gemachtigde	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl			

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein		29 / HP231
Postcode en plaats	6525 EZ	Nijmegen	
Postbus, postcode en plaats	9100	6500HB	Nijmegen

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie		
Afdeling		

	Telefoonnummer	[REDACTED]
	E-mailadres	[REDACTED]@radboudumc.nl
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	[REDACTED]
	Afdeling	[REDACTED]
	Telefoonnummer	[REDACTED]
	E-mailadres	[REDACTED]@radboudumc.nl
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer [REDACTED]
	E-mailadres	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input type="checkbox"/> Nee

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 01 - 04 - 2022 Einddatum (t/m) 31 - 03 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Intravital imaging of ion reabsorption from tubular lumen
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het meten van magnesium absorptie in de nier
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC RU DEC Postadres Postbus 9101, 6500 HB, Nijmegen (HP 231) E-mailadres dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam: RadboudUMC / ██████████		Afdeling: ██████████
	Straat: Geert Groteplein		Huisnummer: 29 / HP231
	Postcode: 6525 EZ	Plaats: Nijmegen	
	Postbus: 9100	Postcode: 6500HB	Plaats: Nijmegen
	E-mail: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl		
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer: ██████████		
	CDL projectnummer: 2021-0038		

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht	
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 2
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
	Overige bijlagen, indien van toepassing	
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging	
<input type="checkbox"/>		

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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	IvD
Plaats	Nijmegen
Datum	17 - 03 - 2022
Handtekening	



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Magnesium (Mg^{2+}) is an essential ion to the human body, and it is therefore important to maintain plasma Mg^{2+} concentrations within a tight physiological range. Failure to do so results in hypomagnesemia, which is associated with many different pathologies. Electrolyte homeostasis is achieved by a balanced intestinal uptake and renal excretion. Moreover, soft tissues and bones serve as storage mechanisms, which allow to rapidly respond to changes in plasma electrolyte concentrations. Over the last decades, studying rare hereditary diseases as well as animal models have resulted in the identification of many genes and proteins that regulate epithelial ion transport along the intestinal tract and in the kidney. Nevertheless, many disease mechanisms of disturbed electrolyte homeostasis remain unexplained, due to the limitations of current available methods to study ion reabsorption *in vivo*.

Distal Convoluted Tubule

In the kidney, the Distal Convoluted Tubule (DCT) is a central hub for the regulation of Mg^{2+} reabsorption. Whereas upstream nephron segments (proximal tubules, loop of Henle) allow bulk reabsorption, the DCT is essential for the fine tuning of Mg^{2+} reabsorption. The DCT determines the final urinary Mg^{2+} concentration, since no reabsorption of this ion takes place beyond this segment. Approximately 10% of the total Mg^{2+} is reabsorbed in the DCT. However, depending on the needs of the body, the percentage may vary. In particular, insulin is essential for the Mg^{2+} reabsorption transport mechanisms in this segment. In DCT, Mg^{2+} uptake from the kidney lumen takes place from the apical side of the renal epithelial cells and extrusion to the blood takes place on the basolateral side of these cells, but the exact identity of all the involved players, and molecular mechanisms regulating these processes are still poorly understood. In the DCT, several proteins determine Mg^{2+} reabsorption, including CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6 (Figure 1A-C). In murine knock-out models, CNNM2, SLC41A3, and TRPM6 knock-out or knock-down were already shown to cause hypomagnesemia, and similar results are expected for RRAGD knock-out mice.

If we look at the DCT segment in detail, it has an apical membrane facing the nephron lumen and a basolateral membrane facing the blood. At the apical membrane of the DCT, Mg^{2+} uptake is mainly mediated by TRPM6, which is likely regulated by factors like intracellular magnesium concentrations and energy signaling (e.g. EGF, insulin, glucose) (Figure 1C). At the basolateral membrane of the DCT,

the exact molecular identity and characteristics of Mg^{2+} extrusion remains to be identified. Important candidate-proteins that are suggested to regulate Mg^{2+} extrusion by acting as a Mg^{2+}/Na^+ exchanger include CNNM2 and SLC41A3, but previously available methods to study this hypothesis are of insufficient quality to prove this to date (Figure 1C). Nevertheless, the highly ATP-dependent $Na^+-K^+-ATPase$ places a central role in Mg^{2+} extrusion by directly providing a Na^+ extrusion mechanism and additionally providing the driving force for these proposed Na^+-Mg^{2+} exchangers (Figure 1C). Therefore, both energy production, which can be inhibited by the ATP synthase inhibitor Oligomycin, and Na^+ reabsorption, which can be inhibited by the use of diuretics (Furosemide and Thiazide) are important for the whole Mg^{2+} reabsorption process (Figure 1C).

Moreover, in addition to these proteins, our lab has recently shown that the small GTPase RagD (RRAGD) plays a key role in systemic Mg^{2+} homeostasis, as patients with mutations in RRAGD exhibit renal Mg^{2+} wasting and hypomagnesemia. RRAGD is a known activator of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) (of which rapamycin is an acute inhibitor). We hypothesize that the RRAGD-mTORC1 pathway regulates the function of TRPM6. However, the role of RRAGD in Mg^{2+} reabsorption still needs to be elucidated (Figure 1C). As stated above, renal Mg^{2+} reabsorption is known to be dependent on the availability of other ions, like Na^+ and K^+ , and on the availability of metabolites like glucose and lipids. Because Western diets are generally disbalanced, having a low Mg^{2+} and K^+ , and high Na^+ and lipid content, it is likely that renal Mg^{2+} reabsorption is impacted by a disturbed nutritional composition, exacerbating the effects of low dietary Mg^{2+} on systemic Mg^{2+} levels (Figure 1C).

Magnesium reabsorption in kidney can be manipulated by pharmacological agents, of which SGLT2 inhibitors are well-known examples. SGLT2 inhibitors are a novel class of glucose-lowering agents that are developed for the treatment of type 2 diabetes. They act by reducing Na^+ and glucose reabsorption in the proximal part of the renal tubule. Consequently, SGLT2 inhibitors are hypothesized to increase Na^+ delivery to more distal segments and result in more Na^+ and Mg^{2+} reabsorption in the thick ascending limb (TAL) and DCT (Figure 1C). Although this hypothesis still needs to be experimentally confirmed, SGLT2 inhibitors are therefore thought to be the first therapeutics that increase Mg^{2+} reabsorption in the kidney. Indeed, the use of SGLT2 inhibitors has been associated with higher serum Mg^{2+} levels in meta-analyses.

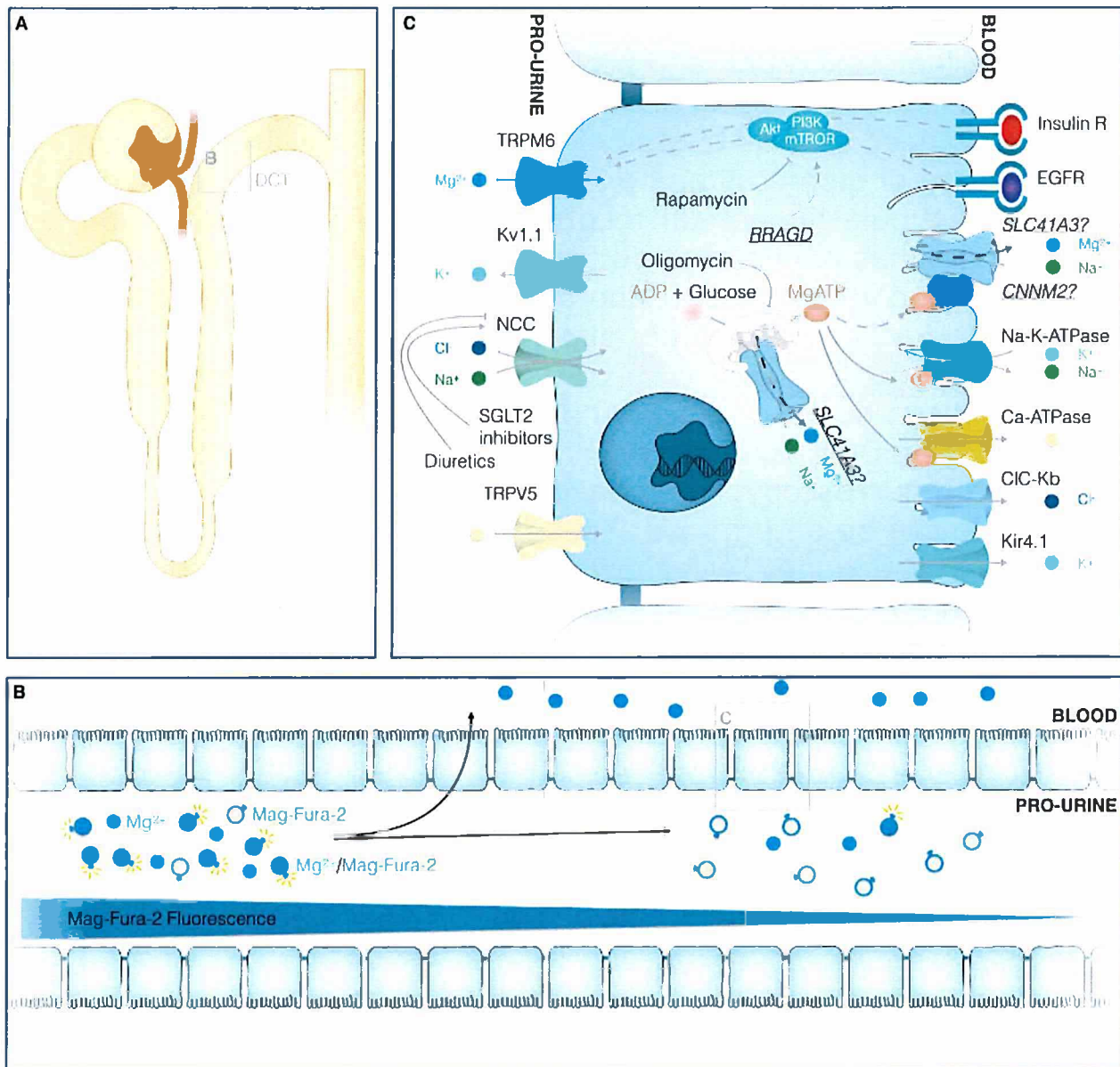


Figure 1. Schematic overview of the nephron showing the localization of DCT, the working mechanism of Mag-Fura-2, and the most important players in ion homeostasis. (A) Schematic depiction of the nephron with DCT segment highlighted. (B) DCT with gradual luminal decline of Mg^{2+} and Mg^{2+} -bound Mag-Fura-2, and a luminal increase of Mg^{2+} -unbound Mag-Fura-2 over the length of a segment. (C) Schematic depiction of the most important players in DCT ion homeostasis. Proteins with question marks have yet unknown function, black lines depict Mg^{2+} movement while grey lines depict other ions or associations.

Technical limitations

To date, *in vivo* ion reabsorption has been mainly determined by analyzing urinary electrolyte excretion using metabolic cages. Although this method is effective, it does not allow to determine the contribution of individual nephron segments. Moreover, it is challenging to

distinguish primary defects and compensatory mechanisms by only analyzing the urinary excretion and protein expression levels. In recent years, live cell imaging and multi-photon imaging have emerged as advanced models to study kidney physiology. In particular, intra-vital imaging of glomeruli and macula densa cells have provided novel insights in tubule-glomerular feedback. For DCT ion reabsorption, intra-vital imaging has never been performed, despite the good accessibility of the cortex for multi-photon microscopy. However, we have recently performed preliminary experiments executed in collaboration with [REDACTED] (USC, LA, USA) that demonstrate that Mag-Fura-2 can be used to determine the intra-luminal Mg^{2+} concentration in the DCT. By intra-vital fluorescence measurements using two-photon microscopy, the intra-luminal Mg^{2+} concentrations along the tubule can be determined. These intra-vital ion transport measurements in the kidney, will allow studying the physiology of ion reabsorption in the DCT. Moreover, this approach can be applied to study the effects of genetic mutations, hormones, pharmaceuticals and metabolic defects. At the laboratory of our collaborator in USC, we are currently performing preliminary experiments to setup similar measurements for Ca^{2+} (using Fura-2 or Fluo-4) and Na^{+} (using CoroNa), of which the data will be expected in the first quarter of 2022.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

This project ultimately aims to explain the regulation of Mg^{2+} reabsorption in the distal convoluted tubule. To reach this goal in the future, our immediate goals are to develop an innovative fluorescent intra-vital ion reabsorption measurement, and start by using this method to study and identify the function of several proteins and pathways that are known to play an important role in the regulation of Mg^{2+} reabsorption.

By developing a technique to measure ion reabsorption in DCT in relation to whole organism biology and physiology, this project has the potential to not only provide much-needed evidence to causally prove many assumptions that were made in previous studies, but also study new hypotheses that could not be studied before. To reach our immediate goal, several subobjectives have been generated. Where some of the included experiments (subobjective 1) are necessary to provide evidence for the applicability of the proposed techniques in the field (e.g. the high Mg^{2+} concentrations and the Mg^{2+} -chelator are meant to model an artificially high and low intra-luminal Mg^{2+} concentration as proof-of-principle) other experiments (subobjective 2

and 3) will already provide much needed new insights in the mechanisms of ion reabsorption in DCT.

Subobjectives:

1. Development of innovative fluorescent intra-vital ion reabsorption live measurements for Mg²⁺.
2. Determine the contribution of important proteins (CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6) in the regulation of Mg²⁺ reabsorption in the distal convoluted tubule.
3. Determine the role of factors that were suggested to regulate Mg²⁺ reabsorption via CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6 function as described above (sodium exchange, intracellular magnesium concentration, metabolism, mTOR pathway).

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Multiphoton imaging to measure ion transport in the kidney tubule has been established in close collaboration with [REDACTED] (USC, LA, expert on *in vivo* multiphoton imaging). All the equipment is readily available at the PRIME facility of the central animal facility in the Radboudumc. Personnel from the Central Animal Facility has experience with multiphoton imaging (e.g. for cancer research). The scientific personnel of the department of [REDACTED] will be trained in the lab of [REDACTED] (USC, LA), as well as in the PRIME facility in the Netherlands. For the mechanistic studies: the department of [REDACTED] has long standing experience with *in vivo* experiments aiming to decipher renal ion reabsorption. Knock-out mouse models have been established over the course of 15 years and are readily available. The scientific staff is trained and experienced in handling these models. Altogether, these approaches ensure that the project is feasible.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Electrolyte reabsorption in the kidney is only partially understood. Genetic studies have identified several players, including CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6, over the last decade. However, the contributions of these proteins to renal Mg²⁺ transport have not been investigated before, because of the absence of methods to do so. As a consequence, it is currently also unknown how the regulation of the

activity of these proteins are regulated in relation to Mg^{2+} reabsorption. Implementation of intra-vital fluorescent measurements of Mg^{2+} reabsorption will be of major importance to increase our understanding of kidney physiology. By actually measuring Mg^{2+} reabsorption in DCT in relation to whole organism biology and physiology, the role of specific genes and metabolic pathways can now be explored.

Societal relevance

Hypomagnesemia is associated with a wide range of common diseases including hypertension, diabetes and muscle cramps. Over the last decade, genetic studies have evidenced that hypomagnesemia can be majorly attributed to defects in renal Mg^{2+} reabsorption. Important proteins that play a role in this Mg^{2+} reabsorption are CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6, but their exact molecular working mechanism is currently undetermined. Identification and characterization of these molecular signaling pathways, and the factors that regulate these, will be of major importance to design novel treatment strategies for hypomagnesemia.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Scientists – This project will result in the availability of a novel technique to study ion reabsorption intravitaly. This will not only be of interest for magnesium based research but for other ions as well. Therefore, this technique will have a large demand and result in future groundbreaking research. Secondly, this project will result in novel knowledge about how Mg^{2+} reabsorption is regulated in the distal part of the kidney tubule. This will result in progression of knowledge and be of interest for future kidney research as well as clinical applications.

Clinicians – When the process of Mg^{2+} reabsorption is elucidated, novel treatments will likely be developed that allow better control of magnesium homeostasis in the body. Moreover, when the role of several proteins in the Mg^{2+} reabsorption is known, patients with mutations in these proteins will benefit from better diagnosis and, potentially, better treatment possibilities.

Patient organizations – First, novel findings will be used to raise awareness for kidney disease. Moreover, many patients with mutations in genes that code for proteins in Mg^{2+} reabsorption are currently lacking good diagnosis. This project will increase the possibility for an accurate diagnosis.

Students - knowledge will be implemented in curriculum.

Funders – Funding agencies like NWO and the European Committee have provided funds to develop this technique.

Experimental animals - instrumental as whole organism model to study actual ion reabsorption in the kidney.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

This project aims to study the following subobjectives:

1. Development of innovative fluorescent intra-vital ion reabsorption live measurements for Mg^{2+} .
2. Determine the relative roles of important proteins (CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6) in the regulation of Mg^{2+} reabsorption in the distal convoluted tubule.
3. Determine the relative role of factors that were suggested to play an important role in Mg^{2+} reabsorption in literature (metabolism, mTOR pathway).

In the first subobjective, we will set-up the newly developed technique in the RadboudUMC and perform several experiments to demonstrate the broad applicability of the technique. In short, mice will be anesthetized and a kidney will be placed on an imaging window. Subsequently, the kidney will be live-imaged under a multi-photon microscope after a magnesium indicator is injected. Moreover, depending on the specific experiment, fluorescent contrast agents will be applied by s.c., i.p. or i.v. injection (route depending on known pharmacokinetics), including dyes for mitochondrial function, metabolic regulation, pH, or fluorescent antibodies for visualizing specific kidney segments or cells. To increase or decrease the reabsorption of magnesium in the kidney, magnesium reabsorption inducing and inhibiting molecules will be used. Currently, we are working in close collaboration with our partner [REDACTED] at USC to determine the most promising ion indicator dye (Mag-fura-2, Mag-fluo-4 and mag-green), the best ion indicator dye concentration, and best method of delivery (s.c., i.p. or i.v. injection). Moreover, other experimental parameters will also be optimized (e.g. concentration and characteristics of contrast dye, imaging settings). All this preliminary data will be available to the RadboudUMC to ensure the use of the least amount of animals possible. In practical terms, we will use only the best ion indicator dye, and the best corresponding concentration and route of injection in our experiments here. In addition, we will also only use the best positive and negative controls (by manipulating serum ion

concentrations both ways) based on the preliminary experiments at the [REDACTED] lab, to demonstrate the applicability of the technique. Moreover, we will be trained in the technique in the [REDACTED] lab at USC. Because of this, we will only need few animals to test the technique in our laboratory and train additional personnel.

Both the experiments with group 2-3 of DAP1, and the basal and follow-up experiments of DAP2 will only be performed if ion-flow through the kidney lumen can be monitored with sufficient resolution to be able to quantify Mg^{2+} reabsorption through the tubule. To do this, we will determine the noise of the obtained measurement-traces by taking the spread in values of at least 10 consecutive measurements of each ROI into account. To determine the signal-to-noise ratio, we will calculate if the difference in fluorescence between the two ROIs is larger than twice the average standard deviation of the measurements from each channel individually. If this signal is larger than twice the standard deviation of the noise, we will consider the measurement to have sufficient resolution. The first subobjective is considered a success if at least we are able to measure Mg^{2+} with sufficient quality to continue experiments.

In the second subobjective, we will use genetic mouse knock-out models for several proteins (CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6) that were shown to play an important role in Mg^{2+} reabsorption, to determine their relative contribution to Mg^{2+} reabsorption in whole organism physiological setting (DAP2, basal experiment). These experiments will only be performed if we are able to measure Mg^{2+} with sufficient quality (in subobjective 1). Moreover, as positive and negative controls, magnesium blood concentrations will be manipulated. This subobjective is considered a success if at least 2 genotypes show differentially regulated Mg^{2+} reabsorption.

In the third subobjective, we will use several pharmacological compounds (Glucose, Insulin, EGF, Oligomycin, Rapamycin, and the diuretics Furosemide and Thiazide) that are known to have an effect on important regulatory pathways which were implicated in the regulation of Mg^{2+} reabsorption. These compounds will only be used on the specific genetic models and their representative controls that have previously been implicated in one or more of these pathways in literature (as described in the background), and compounds will only be used if genotypes showed differentially regulated Mg^{2+} reabsorption in basal experiments of DAP2. This subobjective is considered a success if at least one genotype shows differentially expressed Mg^{2+} reabsorption after the application of specified compounds.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

We have designed the experiments according to the strategy above in order to use the least amount of animals as possible. We will perform all pilot experiments in collaboration with [REDACTED] (USC, USA) to prevent excess use of animals for technique development. As we will only use the best experimental settings that were tested in the pilot-experiments, we will only use the magnesium dye that yielded the best results. Using this knowledge, we are able to initiate the measurements at the RadboudUMC with only few training animals necessary. Next, as follow-up experiments will only be performed if we are able to measure Mg^{2+} with sufficient quality at our local experimental setup, we prevent the use of unnecessary animals. Lastly, by testing which of the proposed genotypes shows a differentially regulated Mg^{2+} reabsorption before doing the follow-up experiments, we are also able to prevent further unnecessary use of animals.

3.4.3 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	Setup of novel experimental approach to monitor renal tubular magnesium concentrations intravitaly.
2	Use of intravital imaging to study the role of CNNM2, Rragd, SLC41A3, and TRPM6 in renal tubular magnesium reabsorption.



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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300 2022 15927	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Setup of novel experimental approach to monitor renal tubular magnesium concentrations intravitaly.

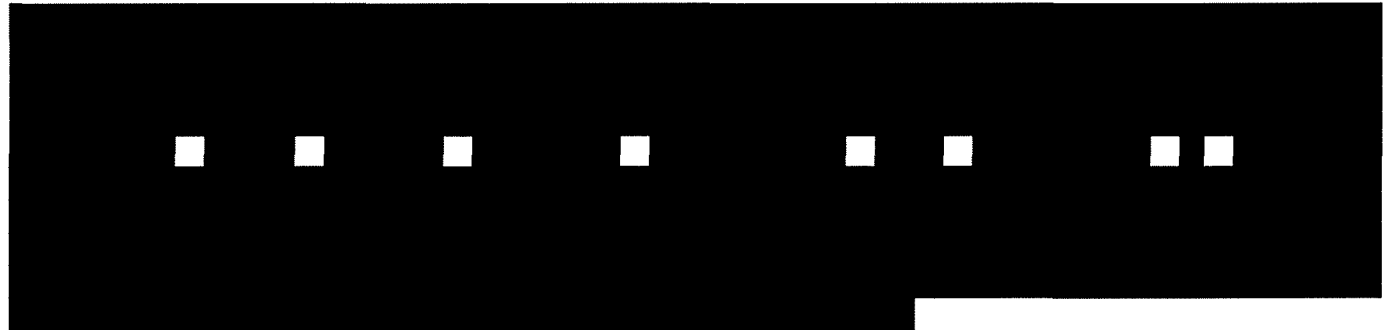
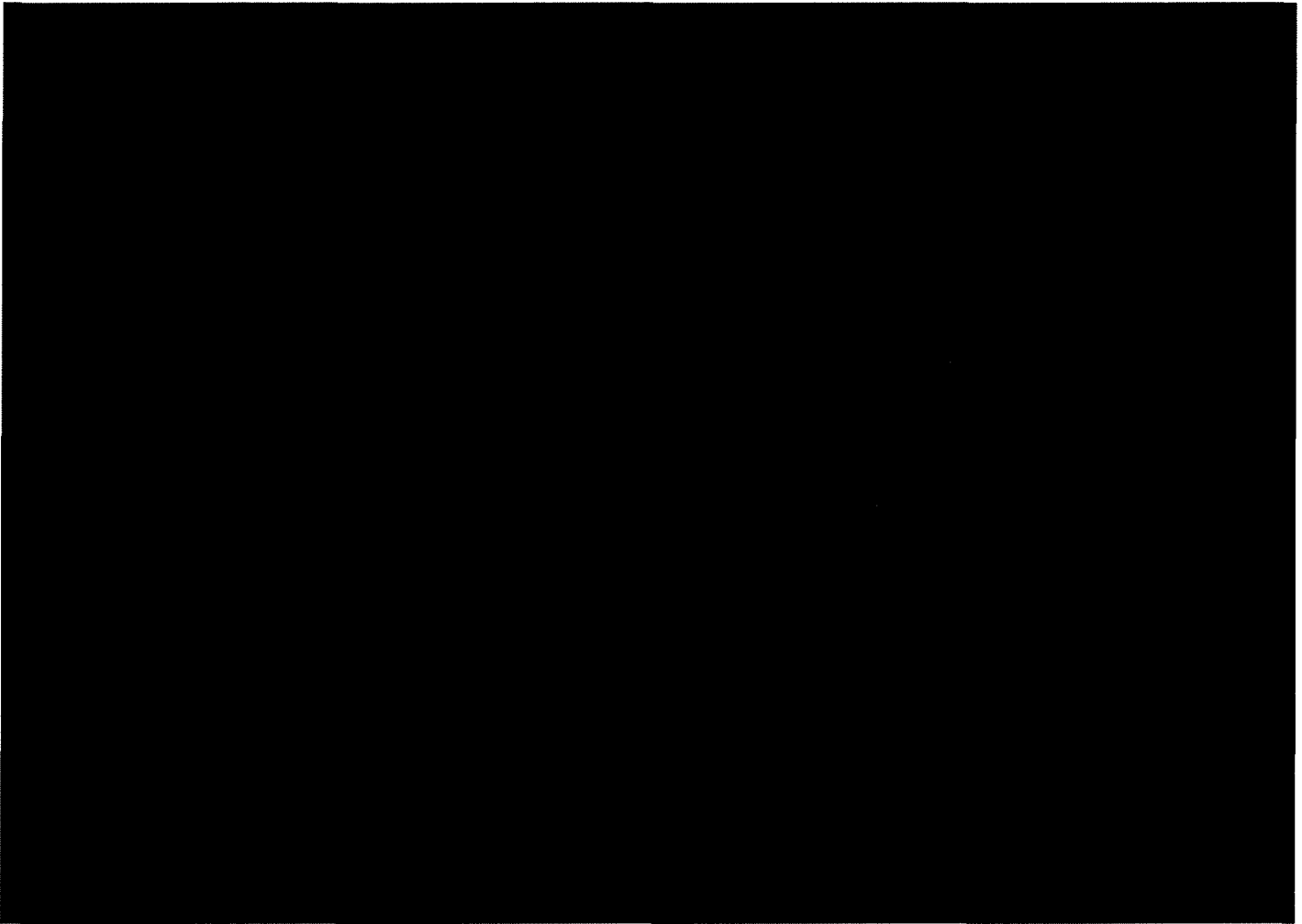
2 Description of animal procedures

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.

We will setup a technique to monitor intra-vital concentrations of Mg²⁺ that is currently being developed in collaboration with partners from USC ([redacted]). In short, a surgical incision in skin and muscle overlaying the kidney is made in anesthetized adult mice, and the kidney is glued to a coverglass. Subsequently, the mouse is placed on the stage of a multi-photon confocal microscope with the kidney fixed on the objective, while body temperature is maintained. A magnesium-specific fluorescent ion-sensor dye (e.g. Mag-Fura-2, of which the choice will be based on the best results from the pilot-experiments performed at the [redacted] lab) and fluorescent contrast agent as control for urine flow (e.g. AF680-conjugated albumin) are injected intravenously, which are automatically concentrated in the pre-urine by the filtration ability of the kidney. Preliminary data already shows that these dyes are indeed detectable in different kidney segments with high quality and resolution (Figure 2A-C). DCT segments are defined, and two unique acquisition points within the same DCT segment are selected. The magnesium reabsorption between these points is determined by subtracting the control-corrected fluorescent signal obtained from the most downstream point from the control-corrected fluorescent signal from the

upstream point. By taking into account the distance between the acquisition points and the volume in the segment, the Mg^{2+} fluxes can be accurately calculated. Preliminary data already shows that magnesium reabsorption can be quantified using this approach (Project Proposal Figure 1B, Figure 2D-F).



Our primary outcome parameter will be this difference in fluorescence intensity as measurement for decrease in extracellular electrolyte levels over the course of a DCT segment, and we will use it to monitor the physiological and pathological re-absorption of these electrolytes in intact kidneys. The aim of this DAP is to set-up the technique at our university and train additional researchers in order to produce reproducible results for further experiments.

When these experiments are finished and the results are analyzed we will decide if we proceed with the follow-up experiments. Follow-up experiments will be executed when we are able to reliably use multi-photon imaging to monitor electrolyte reabsorption from the pro-urine in different segments of the kidney.

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

A kidney imaging window (KIW) will be transplanted onto 12-wk-old wild-type C57BL/6N mice. The KIW consists of a titanium ring on top of which a glass coverslip is glued. The implantation of KIW includes surgical incision of the skin overlaying the right kidney; the ring is placed into the incision and fixed by placing the skin within a groove on the side of the ring and further sutured which ensures its fixation. Subsequently, while under anesthesia, mice will be subjected to an injection of a Mg^{2+} dye, to monitor representative Mg^{2+} flow and concentrations. The route of injection and the choice of the dye and concentrations are based on known pharmacokinetics and the best results from the pilot experiments performed at the [REDACTED] lab. Only the most promising Mg^{2+} dye will be used in our experiments. The dye that will be used is readily available from Thermo Fisher Scientific.

The kidney will be imaged with (intra-vital live) multiphoton microscopy (MPM) to monitor the ion dynamics in luminal kidney and interaction with the local microenvironment at subcellular resolution. Imaging sessions will be performed under terminal anaesthesia. Outcome parameters include ion reabsorption from the lumen as well as urinal ion extrusion.

During multiphoton imaging, fluorescent contrast agents will be applied by s.c., i.p. or i.v. injection (route depending on known pharmacokinetics), including dyes for mitochondrial function, metabolic regulation, pH, or fluorescent antibodies for visualizing specific kidney segments or cells. The appropriate optical imaging agents will be selected for the specific experiment and research question and maximal injection volumes and concentrations will be used according to the datasheet and the animal welfare guidelines.

The area of optical reporter development is a fast-moving field and we will constantly review literature and integrate new, improved reporters to enhance the quality and biomedical depth of our experiments. A maximum of three groups of animals will be measured. The first group receives no additional injection after the administration of the dye to monitor physiological ion reabsorption (group 1). If Mg^{2+} flow through the kidney lumen can be monitored with sufficient resolution to be able to quantify Mg^{2+} reabsorption through the tubule in group 1, two additional groups of mice will be subjected to injections containing a physiological salt solution with high levels of Mg^{2+} to increase (group 2) or a physiological salt solution without Mg^{2+} but with the Mg^{2+} -chelating agent EDTA to decrease (group 3) the Mg^{2+} blood concentration during the live imaging protocol when the mice are under terminal anesthesia.

At the end of the imaging experiment, mice will be sacrificed under anaesthesia by exsanguination, followed by cervical dislocation without the animal regaining consciousness.

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

To set-up the technique at our university and train additional researchers to perform the experiments, we expect to use 35 mice. This expectation is based on the following considerations.

We expect to use 8 animals to train researchers to perform the operation regarding the kidney imaging window, and test dye injection and imaging. No dropout of these animals is expected because training is the main goal and possible difficulties with dye injection or imaging are acceptable during training. From pilot experiments executed at the laboratory of our collaborator, the most promising dye for Mg^{2+} imaging will be chosen. This collaborator is currently optimizing dye concentrations and the method for injection. Our primary outcome parameter will be ion flow, and based on data from the pilot experiments of our collaborator, we expect to need 8 animals to reliably monitor electrolyte concentrations intra-vitally. A 10% dropout rate is taken into account for these experiments. This dropout rate is caused by biological and technical factors, such as failure of correct dye injection or distribution, or difficulties with imaging in the limited time-window that these dyes provide. Correction for dropout rate is done per group with the following formula: $N = \text{animal} / (1 - \text{dropout rate})$. Accounting for the dropout rate, a maximum of 9 animals will be used per group. 3 groups will result in a maximum of 27 mice. Including 8 animals reserved for training, a total of 35 mice will be used.

Considerations for minimization of the number of animals: We collaborate intensively with our partners in USC to define the most promising dyes for electrolyte concentrations, which prevents the addition of unnecessary animal groups and increases our chances of success significantly. Moreover, the main researcher will be trained extensively by this collaborator to prevent an unnecessary loss of animals due to technical complications.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	01	Commercial supplier	Adult	35	m/f	No	C57BL6/n

Provide justifications for these choices

Species

We will use the mus musculus because of multiple reasons. First, it is the most common and widely used laboratory animal. Moreover, mouse physiology is very much like human physiology and all nephron parts that we are interested in are represented in mice. Moreover, murine size is ideal to be used for multiphoton microscopy (MPM), as their organs are large enough to be used as a model for human physiology but small enough to make the best use of the MPM characteristics. For example, as the MPM laser has a maximal penetration length, using larger animals will result in a relatively lower maximal penetration.

Origin

Mice will be obtained from a commercial supplier (e.g. Charles River) because this will be the best option from an economical, logistic and animal point of view

Life stages

We will use adult mice with an age of 10-14 weeks. These mice are fully grown and are most likely to result in the least deviation and spread in data.

Number

8 mice to train

9 mice per group (3 groups) -> 27 mice

Total = 35 mice

Gender

We aim to use both genders equally to guarantee the most representative results

Genetic alterations

n.a.

Strain

We will use the C57bl/6N strain because this is closest to the substrains used in DAP2 (better translation between different mouse models).

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Experiments will last one day-part (4 hours) in total, are terminal and are completely performed under isoflurane anesthesia. We will monitor the animals closely during the execution of all experiments to prevent animals from waking up from anesthesia.

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

None. Animals are completely healthy and do not have genetic alterations nor will undergo procedures prior to anesthesia.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

E. Humane endpoints
May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?
<input checked="" type="checkbox"/> No > Continue with question F.
<input type="checkbox"/> Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

n.a.

F. Classification of severity of procedures
Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Non-recovery; animals will not wake up from anesthesia.

G. 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

Electrolyte homeostasis is tightly regulated on both inter- and intra-organ levels and is, therefore, impossible to study in simple cell or *ex vivo* models. As an *in vivo* mammalian model is essential, and the continuous collaboration between different organs like intestine, bone and kidney, are important to consider, the electrolyte homeostasis cannot be studied in lower species. Given the large availability of previous data and genetic knock-out models, the C57bl/6N mouse is the primary choice.

Reduction

All initiation and pilot studies will be performed by our collaborator at USC. Because we collaborate intensively and they are willing to train our main researcher, only few animals have to be used for set-up of the technique and training of additional researchers. Moreover, all doses and administration routes of dye injection will be optimised prior to our experiments.

Refinement

Because mice are wild-type and do not require any experimental handling prior to anaesthesia, mice will be housed with free access to food and water, and are compatible with group housing and the presence of an enriched environment. Moreover, the discomfort for the animals is further minimized by the application of anaesthetics, and diligent care and attention to any sign of discomfort in the animal.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

n.a.

J. 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 K.

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.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Because the microscope needs free access to the kidney, an incision in the skin overlaying the kidney will be made under anesthesia, and a glass coverslip is glued on the kidney. Moreover, injection of potentially harmful compounds is performed during anesthesia. Therefore, mice subjected to these procedures can not make a full recovery, and killing the mice during anesthesia results in the least discomfort.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Exsanguination under isoflurane anaesthesia

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.a.



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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300 2022 15927	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Use of intravital imaging to study the role of CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6 in renal tubular magnesium reabsorption.

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.

Here, we aim to determine the role of candidate proteins in magnesium homeostasis using both knock-out mouse models and pharmacological compounds targeting specific candidate proteins in combination with the MPM live-imaging technique described in DAP1. This procedure will specifically determine the role of these candidate proteins in the ion homeostasis in the distal part of the tubule.

We will breed knock-out mice for CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6, and we will expose both genetically altered and wild-type mice to pharmacological compounds (Glucose, Insulin, EGF, Oligomycin, Furosemide, Thiazide, SGLT2 inhibitors, Rapamycin) during the experiment while the animals are under anaesthesia only, and measure if luminal DCT Mg²⁺ concentrations are differentially regulated in genetically altered and pharmacologically exposed mice. Therefore, our primary outcome parameter will be fluorescence intensity as measurement for extracellular electrolyte levels, and we will use it to monitor the physiological and pathological re-absorption of these electrolytes in intact kidneys. Moreover, we will harvest the organs and measure mRNA and protein expression of ion regulation-related genes.

Of note: CNNM2 full knock-out mice are embryonically lethal, so we will use heterozygotes (no discomfort). The same holds true for TRPM6 full KO, so we will use intestine specific KO (no discomfort). Both RRAGD and SLC41A3 full KO mice show no discomfort.

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

All experiments described in DAP2 are meant as implication of the in DAP1 introduced technique to answer novel research questions.

Basal experiment

For transgenic mice (for CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6) and their littermate wild-types, a kidney imaging window (KIW) will be transplanted onto the mice. The KIW consists of a titanium ring on top of which a glass coverslip is glued. The implantation of KIW includes surgical incision of the skin overlaying the right kidney; the ring is placed into the incision and fixed by placing the skin within a groove on the side of the ring and further sutured which ensures its fixation.

Mice will be subjected to an injection of a Mg^{2+} dye, to monitor representative Mg^{2+} flow and concentrations. The route of injection and the choice of the dye and concentrations are based on known pharmacokinetics and the best results from the pilot experiments performed at the [REDACTED] lab. Only the most promising Mg^{2+} dye will be used in our experiments.

The kidney will be imaged with (intra-vital live) multiphoton microscopy (MPM) to monitor the ion dynamics in luminal kidney and interaction with the local microenvironment at subcellular resolution.

Imaging sessions will be performed under terminal anaesthesia. Outcome parameters include ion reabsorption from the lumen as well as urinal ion extrusion.

During multiphoton imaging, fluorescent contrast agents will be applied by s.c., i.p. or i.v. injection, including dyes for mitochondrial function, metabolic regulation, pH, or fluorescent antibodies for visualizing specific kidney segments or cells. The appropriate optical imaging agents will be selected for the specific experiment and research question, and will be based on the best results from DAP1. The maximal injection volumes and concentrations will be used according to the datasheet and the animal welfare guidelines. The area of optical reporter development is a fast-moving field and we will constantly review literature and integrate new, improved reporters to enhance the quality and biomedical depth of our experiments.

After the experiment, mice will be sacrificed under anaesthesia by exsanguination, followed by cervical dislocation without the animal regaining consciousness and organ tissue will be excised for subsequent analyses. These will include mRNA and protein isolation to measure levels of genes involved in ion transport and immunohistochemistry to study morphology and protein localization. As urine and blood ion concentrations are used as golden standard in current literature to determine kidney reabsorption rates of ions, urine and blood will be collected after termination.

Follow-up experiments

Depending on the outcome of the experiments described in DAP1 and the experiments described under basal experiment (as explained under Research Strategy), we may perform follow-up experiments:

I) Subject animals to i.v. injections with concentrated ions of interest or specific ion-chelators.

II) Subject animals to pharmacological compounds that specifically target proteins of interest.

Follow-up experiments will only be performed if Mg^{2+} flow through the kidney lumen can be monitored with sufficient resolution to be able to quantify Mg^{2+} reabsorption through the tubule (as described in DAP1). The consideration to include follow-up experiments I and II is made for each genotype separately, and follow-up experiments will only be performed for the genotypes that yield sufficient resolution genotype-specific differences in Mg^{2+} flow as measured in the basal experiment. Each individual mouse will receive a maximum of 4 injections.

I) Subject animals to i.v. injections with concentrated ions of interest or specific ion-chelators during MPM live-imaging.

Similar to genomic wild-type mice in DAP1, genetic modified and representative wild-type mice will be subjected to injections containing a physiological salt solution with high levels of Mg^{2+} to increase (group 2) or a physiological salt solution without Mg^{2+} but with the Mg^{2+} -chelating agent EDTA to decrease (group 3) the Mg^{2+} blood concentration of ions during the live imaging protocol when the mice are under terminal anaesthesia.

II) Expose animals to pharmacological compounds that specifically target proteins of interest.

Animals will be subjected to MPM live-imaging as described under the basal experiment. In addition, genomic altered or representative wild-type mice will be subjected to a single or multiple injections containing specific pharmacological compounds (table 1) during the live imaging protocol when the mice

are under terminal anaesthesia. The subsequent handling of the experiment will be as described under the basal experiment. The selection of pharmacological compounds is different for each genotype, where compounds are only used on genotypes which are expected to show an altered reaction on renal Mg²⁺ handling compared to their representative wild-types (table 1). Concentrations of the pharmacological compounds used will be within the range of normal usage.

	CNNM2	RRAGD	SLC41A3	TRPM6
Glucose	No	No	No	Yes
Insulin	No	No	No	Yes
EGF	No	No	No	Yes
Oligomycin	Yes	Yes	Yes	Yes
Furosemide	Yes	Yes	Yes	Yes
Thiazide	Yes	Yes	Yes	Yes
SGLT2 inhibitor	No	Yes	No	Yes
Rapamycin	No	Yes	No	Yes

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

To perform the experiments described above, we expect to use maximally 744mice. This expectation is based on the following considerations.

Group sizes of 7 to 10 animals are anticipated, which will be determined exactly at the level of the work protocols, in consultation with the university statistician after our collaborator has obtained all preliminary data. Similar to DAP1, a 10% dropout rate is taken into account. This dropout rate is caused by biological and technical factors, such as failure of correct dye injection or distribution, or difficulties with imaging in the limited time-window that these dyes provide. Correction for dropout rate is done with the following formula per group: $N = \text{animal} / (1 - \text{dropout rate})$.

Basal experiment. 4 different genotypes with representative wild-types are included. 8 groups will be included in the basal experiment. Accounting for the dropout rate, a maximum of 12 mice will be used per group, resulting in a maximum of 96mice for the basal experiment.

Follow-up experiments. For follow-up experiment I), two groups each for 4 different genotypes with representative wild-types are included. In total, a maximum of 16 groups will be included in the follow-up experiment I). Accounting for the dropout rate, a maximum of 12 mice will be used per group, resulting in a maximum of 192 mice for follow-up experiment I). For follow-up experiment II), varying amounts of compounds are included for each of the 4 different genotypes with representative wild-types. In total, a maximum of 38 groups will be included in the follow-up experiment II). Accounting for the dropout rate, a maximum of 12 mice will be used per group, resulting in a maximum of 456 mice for follow-up experiment II).

	CNNM2	RRAGD	SLC41A3	TRPM6	Subtotal
	<u>Basal</u>				
	12+12	12+12	12+12	12+12	96
	<u>Follow-up (I)</u>				
High magnesium	12+12	12+12	12+12	12+12	
EDTA	12+12	12+12	12+12	12+12	192
	<u>Follow-up (II)</u>				
Glucose	-	-	-	12+12	
Insulin	-	-	-	12+12	
EGF	-	-	-	12+12	
Oligomycin	12+12	12+12	12+12	12+12	168
Furosemide	12+12	12+12	12+12	12+12	
Thiazide	12+12	12+12	12+12	12+12	
SGLT2 inhibitors	-	12+12	-	12+12	240
Rapamycin	-	12+12	-	12+12	48
Total					744

Considerations for minimization of the number of animals: We collaborate intensively with our partners in USC to define the most promising dyes for electrolyte concentrations, which prevents the addition of unnecessary animal groups and increases our chances of success significantly. Moreover, the main researcher will be trained extensively by this collaborator to prevent an unnecessary loss of animals due to technical complications.

B. The animals							
Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.							
Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	01	Own breeding	Adult	144	m/f	yes	CNNM2
2	01	Own breeding	Adult	192	m/f	yes	RRAGD
3	01	Own breeding	Adult	144	m/f	yes	SLC41A3
4	01	Own breeding	Adult	264	m/f	yes	TRPM6

Provide justifications for these choices

Species

We will use the mus musculus because of multiple reasons. First, it is the most common and widely used laboratory animal. Moreover, mouse physiology is very much like human physiology and all nephron parts that we are interested in are represented in mice. Moreover, murine size is ideal to be used for multiphoton microscopy (MPM), as their organs are large enough to be used as a model for human physiology but small enough to make the best use of the MPM characteristics. For example, as the MPM laser has a maximal penetration length, using larger animals will result in a relatively lower maximal penetration. Lastly, all proposed genotypic altered mice are already available at RadboudUMC and this data will complement already existing datasets with data from these animals thereby resulting in reuse of data and reaching more impact.

Origin

Genetically modified mice and representative wild-types are already in house available.

Life stages

We will use adult mice with an age of 10-14 weeks. These mice are fully grown and are most likely to result in the least deviation and spread in data.

Number

96 mice in basal experiments
192 in follow-up I
456 in follow-up II
Total of maximally 744 mice

Gender

We aim to use both genders equally to guarantee the most representative results and reduce breeding numbers

Genetic alterations

From our previous studies we know that the proposed genetic alterations (CNNM2, RRAGD, SLC41A3 and TRPM6) in mice are associated with magnesium reabsorption from the kidney lumen. For CNNM2, TRPM6 and SLC41A3 we already have performed extensive characterisation of these genotypes and for RRAGD we will gather this in the near future with our collaborators. However, actual reabsorption has never been studied and this missing data is considered a major limiting factor for the value of the already existing data. Therefore, the use of these genotypes will not only answer important questions, but will also increase value of previous animal studies

Strain

Mice with genetic alterations are already available, and have similar background strains (see below). Wild-type littermates will be used as controls.
CNNM2: C57BL6/N
RRAGD: C57BL
SLC41A3: C57BL6/N
TRPM6 floxed: C57BL6/NCrI

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Experiments will last one day-part (4 hours) in total, are terminal and are completely performed under isoflurane anesthesia. We will monitor the animals closely during the execution of all experiments to prevent animals from waking up from anesthesia.

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

n.a.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

E. 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 F.

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

Indicate the likely incidence.

n.a.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Non-recovery; animals will not wake up from anesthesia.

G. 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

Electrolyte homeostasis is tightly regulated on both inter- and intra-organ levels and is, therefore, impossible to study in simple cell or *ex vivo* models. As an *in vivo* mammalian model is essential, and the continuous collaboration between different organs like intestine, bone and kidney, are important to consider, the electrolyte homeostasis cannot be studied in lower species. Given the large availability of previous data and genetic knock-out models, the C57bl/6 mouse is the primary choice.

Reduction

All initiation and pilot studies will be performed by our collaborator at USC. Because we collaborate intensively and they are willing to train our main researcher, only few animals have to be used for set-up of the technique and training of additional researchers. Moreover, all doses and administration routes of dye injection will be optimised prior to our experiments. The expertise of a (local) breeding coordinator will be used to avoid unnecessary breeding of (KO) animals.

Refinement

Because mice do not require any experimental handling prior to anaesthesia, mice will be housed with free access to food and water, and are compatible with group housing and the presence of an enriched environment. Moreover, the discomfort for the animals is further minimized by the application of anaesthetics during execution of procedures, and diligent care and attention to any sign of discomfort in the animal.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

n.a.

J. 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 K.

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.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

At the end of the study we will organ tissue, blood and urine for biochemical analysis, or immunohistochemistry.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Exsanguination under full isoflurane anesthesia

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.a.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD10300 2022 15927 / 2021-0038
2. Titel van het project: Intravital imaging of ion reabsorption from tubular lumen
3. Titel van de NTS: Het meten van magnesium absorptie in de nier

4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 17-03-2022
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 22-03-2022
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 29-03-2022 tot 27-06-2022 / 11-07-2022 (de beantwoording d.d. 27-06-2022 is op 11-07-2022 op adequate wijze verwerkt in de projectaanvraag)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 27-06-2022 / 11-07-2022
 - advies aan CCD: 15-07-2022

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 29-03-2022
 - Datum antwoorden: 27-06-2022
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Algemeen:

Het doel van uw projectaanvraag is niet helemaal duidelijk voor de commissie. Een recent elders (LA, USA) ontwikkelde methode voor het meten van Mg^{2+} concentraties in het lumen van het distale convoluut van het nefron van de muis wordt geïntroduceerd in uw lab, en deze methode wordt gevalideerd door de systemische Mg^{2+} concentratie te manipuleren. Naast experimenten die leiden tot hogere of lagere Mg^{2+} concentraties (het eerste subdoel) worden experimenten beschreven met knockout dieren met en zonder toediening van bepaalde farmaca (subdoel 2 en 3). Het is niet duidelijk of de experimenten voor subdoel 2 en 3 dienen ter validatie van uw meetmethode (de rol van de eiwitten en modulators is bekend, getest wordt of de Mg^{2+} concentratie overeenkomt met de verwachtingen), of dat het onderzoeksvragen betreft die nieuwe kennis zullen opleveren. In het eerste geval zou onderbouwd moeten worden waarom al deze knockouts en al deze farmaca noodzakelijk zijn

voor de validatie van de meetmethode. In het laatste geval dient in de introductie helder beschreven te worden welk specifiek kennisiaat onderzocht wordt met deze experimenten, en dient de beschrijving van het wetenschappelijk belang (bij 3.3.1 en 3.3.2) aangevuld te worden.

Antwoord 1: De experimenten die in subdoel 1 staan beschreven dienen om de techniek te valideren, terwijl de experimenten die in subdoel 2 en 3 staan beschreven dienen om onderzoeksvragen te beantwoorden die nieuwe kennis zullen opleveren. We hebben zowel de introductie als het wetenschappelijk belang behoorlijk uitgebreid met een aantal secties die het kennisiaat beter introduceren en dat ook opgenomen in de research goals en feasibility.

In uw onderzoek wilt u de Mg^{2+} concentratie verlagen door toediening van de chelator EDTA. Het gebruik van EDTA in een *in vivo* setting zal ook de calciumstofwisseling verstoren (en waarschijnlijk veel sterker dan de magnesiumhuishouding, gezien de affiniteitsconstanten van EDTA voor deze elementen). Ook rijst de vraag hoe de andere natuurlijke chelatoren voor magnesium zoals ATP, ADP, citraat zullen reageren op EDTA en de verschuivende evenwichten. Kunt u uw visie hierop geven en uitleggen waarom u (desondanks) voor deze aanpak kiest?

Antwoord 2: Het is inderdaad zo dat EDTA geen specifieke Mg^{2+} chelator is, maar ook andere divalente kationen beïnvloedt. Nu willen we EDTA enkel gebruiken als controle om aan te tonen dat voorgestelde setup en methode in staat is om magnesiumreabsorptie te visualiseren. Vanuit de pilot experimenten die we hebben uitgevoerd in samenwerking met USC-LA weten we al dat de Mag-Fura-2 fluorescentie over de lengte van de DCT afneemt terwijl de fluorescentie van een controle dye (Alexa Fluor 680-conjugated albumin) gelijk blijft. Dit suggereert dat de afname specifiek is voor Mag-Fura-2 en niet wordt veroorzaakt door veranderingen in dye concentratie of quenching. Alexa Fluor 680-conjugated albumin vormt daarmee een mooie controle voor de relatieve hoeveelheid Mag-Fura-2 in de DCT. Het is echter nog niet volledig uitgesloten dat de afname in Mag-Fura-2 fluorescentie wordt veroorzaakt door factoren die niets te maken hebben met de conformatie-verandering die wordt geïnduceerd door de binding met ionen. Om dit te testen willen we experimenten met EDTA uitvoeren, waarbij de vrije ionconcentratie in het lumen vele malen lager zal zijn dan zonder EDTA. Dat in dit geval zowel de vrije Mg^{2+} als Ca^{2+} concentratie lager zal zijn maakt voor het gebruik als negatieve controle niet uit. We verwachten dan een zeer lage fluorescentie op te pikken, waarbij het verschil tussen het fluorescente signaal zonder EDTA versus met EDTA het gedeelte van het signaal is dat indicatief is voor de aanwezigheid van ionen.

Ook is het zo dat het gebruik van de chelator verstorend zal werken voor natuurlijk chelatoren zoals ATP. Omdat wij de EDTA conditie enkel gebruiken als controle om aan te tonen dat het fluorescentie signaal specifiek is voor de aanwezigheid van ionen zal dit voor ons geen probleem zijn. Verder zal EDTA in onze setting alleen in het nefronlumen en het bloed voorkomen en niet intracellulair in de DCT, en zal de blootstelling van korte duur zal zijn, waardoor de effecten op intracellulaire signalering minimaal zullen zijn. Om dit alles beter te introduceren hebben we de volgende sectie aangepast; DAP1,2 Animal Procedures.

De inleiding is relatief kort, de rol van de eiwitten die in de doelstelling worden genoemd is niet geïntroduceerd. Hoe verhoudt de rol van de genoemde eiwitten zich tot het gebruik van knockouts en de validatie van dat gebruik (komt het overeen met verwachting)? De commissie vraagt u meer inzicht te bieden waarom dit gebruik belangrijk is, mede ook in relatie tot verstoringen van calcium- en natrium-niveaus die onlosmakelijk met de magnesiumhuishouding zijn verbonden.

Antwoord 3: De knock-outs laten allemaal een verstoorde magnesium opname in de nier zien. Op basis van de verhoogde magnesiumconcentratie in de urine, is het niet mogelijk om te bepalen waar de defecten in de nier optreden. De gevolgen van de knock-outs specifiek in de DCT weten we niet. Het is belangrijk om inzicht te krijgen in de mechanismen van verstoorde magnesiumopname in de DCT, omdat dit het op de langere termijn mogelijk maakt therapie te ontwikkelen die hierop aangrijpt.

De knock-outs zijn direct relevant voor de patiënten die door genetische mutaties in deze eiwitten een magnesium tekort ontwikkelen. Als we kunnen bepalen waar de verstoring van de magnesium reabsorptie precies zit, dan kunnen we ook gericht proberen om een therapie te vinden die compenseert voor dit verlies. Om de eiwitten beter te introduceren hebben we de achtergrond flink aangescherpt, en een beschrijvend figuur toegevoegd. Zie daarvoor de veranderde tekst onder antwoord 1.

De aanvraag maakt nergens duidelijk hoe magnesiumfluxen/magnesiumtransport afgeleid worden van veranderende concentraties magnesium, gemeten aan de hand van fluorescentieverschillen.

Antwoord 4: We identificeren eerst DCT fragmenten die met een redelijke lengte waarneembaar zijn in het focal plane van de microscoop. Binnen deze aaneengesloten segmenten definiëren we een proximale en distale region-of-interest waarin we beide het fluorescente signaal van de magnesium indicator (mag-fura-2) en een controle dye (Alexa Fluor 680-conjugated albumin) kwantificeren. Door de ratio van mag-fura-2/Aexa Fluor 680-conjugated albumin gemeten in de distale regio af te trekken van de ratio gemeten in de proximale regio van de DCT, krijgen we een delta-(mag-fura-2/Aexa Fluor 680-conjugated albumin) die indicatief is voor de hoeveelheid ge-reabsorbeerde magnesium.

We hebben dit nu toegevoegd aan de experimentele methode in DAP1.

Project Proposal:

-3.1 De achtergrondinformatie is, zoals gezegd, erg summier. De commissie mist een kort overzicht van de reeds bestaande kennis over de regulatie van de magnesiumhuishouding, inclusief de daarbij betrokken eiwitten, de relatie met de Ca^{2+} - en Na^{+} - huishouding, en mogelijke modulators. Een 'graphical abstract' met daarin de eiwitten, de modulators die hierop inspelen, en de manier waarop dit het (b.v.) Mag-Fura signaal zal beïnvloeden zou dit kunnen verhelderen. Op dit moment sluiten de achtergrond en de doelstellingen niet naadloos op elkaar aan. De in DAP2 gepresenteerde tabel is nu niet navolgbaar, omdat deze informatie ontbreekt.

Antwoord 5: We hebben de achtergrond informatie uitgebreid en een graphical abstract toegevoegd waarin alle spelers (zowel ionen, eiwitten en pharmacological compounds) die in deze aanvraag staan beschreven genoemd worden. Ook hebben we een panel toegevoegd met de werking van de Mag-Fura-2 dye. Zie daarvoor de veranderde tekst onder antwoord 1 en antwoord 4. Om te voorkomen dat we meer dieren gebruiken dan nodig, gebruiken we pharmacological compounds enkel op de genotypes waarin we een effect verwachten te zien wat relevant is om de functie te kunnen verklaren.

-3.3.2: De betrokkenen zijn benoemd, maar hun belangen zijn nauwelijks omschreven. Graag aanvullen (zie ook de kwestie onder 'Algemeen': validatie of ook basaal onderzoek). Is het belang van patiëntenorganisaties juist omschreven?

Antwoord 6: We hebben de sectie over de betrokkenen sterk uitgebreid en aangepast. Zie daarvoor antwoord 1.

-3.4.1: U vermeldt dat in nauwe samenwerking met een lab in Californië op dit moment de beste fluorescente kleurstoffen, concentraties, toedieningsmethoden en andere experimentele parameters (welke?) worden bepaald, waardoor u relatief weinig dieren nodig heeft voor subdoel 1. Het wordt niet duidelijk in hoeverre in deze aanvraag verschillende kleurstoffen onderzocht zullen worden en wat de redenen daarvoor zijn. De tekst van de aanvraag (3.4.1, 3.4.2, uitwerking van de experimenten in de DAPs) lijkt niet consistent wat dit betreft.

Antwoord 7: We zullen tijdens het werk in Californië verschillende kleurstoffen testen en ENKEL de beste in het onderzoek dat hier wordt voorgesteld gebruiken. We zullen dus maar gebruik maken van een kleurstof. Aan de hand van de data die we op dit moment al hebben verzameld is dit waarschijnlijk mag-fura-2 maar het zou nog kunnen zijn dat een andere kleurstof beter blijkt te zijn (bijvoorbeeld Mag-fluo-4 of mag-green). Mocht dat laatste het geval zijn, dan zullen we de beste kleurstof gebruiken voor alle experimenten. Andere experimentele parameters die worden geoptimaliseerd in Californië zijn bijvoorbeeld de concentratie van contrast- kleurstoffen die we willen gebruiken en de frequentie en timing van imagen. We hebben nu de genoemde secties zo aangepast dat dit duidelijker naar voren komt.

-3.4.1: Er zijn corticale en medullaire nefronen. Welk type nefronen gaat u onderzoeken met de multi-foton microscopie? Wordt deze keuze bepaald door de locatie (dicht onder de oppervlakte van de nier), en zijn de distale delen van deze twee typen nefronen vergelijkbaar?

Antwoord 8: De DCT van zowel de corticale als medullaire nefronen liggen in de cortex en zijn daarom bereikbaar voor MPM. We zullen geen onderscheid maken tussen deze nefronen en verwachten ook niet dat er veel verschil zal zijn tussen deze nefronen met betrekking tot magnesium reabsorptie in de DCT.

-3.4.1: Het onderzoek voor subdoelen 2 en 3 wordt gestart indien met voldoende resolutie / voldoende kwaliteit de Mg^{2+} -reabsorptie in de tubulus kan worden gemeten. Kunt u dit entreecriterium concreter formuleren, zodat de lvD handvatten heeft om hierop toe te zien?

Antwoord 9: We zullen een signal-to-noise ratio bepalen waarbij het signal wordt gedefinieerd door het verschil in het fluorescente signaal tussen de twee ROIs op het moment van de meting, en de noise wordt gedefinieerd door de standaard deviatie van de ruis van beide ROIs gemiddeld op het moment van de meting. Het signaal zal minimaal twee keer groter moeten zijn dan de standard deviatie van de ruis om het als betrouwbare meting te zien. We hebben dit in de tekst aangepast.

-3.4.1: De keuze voor juist deze knockout-modellen en deze farmaca is niet toegelicht (hier of in een 'graphical abstract' in 3.1). In DAP2 is een tabel toegevoegd waaruit blijkt dat niet alle farmaca in alle knockout-modellen worden uitgetest, en dat u meer farmaca zult gebruiken dan hier genoemd. Zoals gezegd ontbreekt de onderbouwing daarvoor, waardoor de keuzes niet navolgbaar zijn. Hier vermeldt u dat de farmaca alleen toegediend worden aan RRAGD en TRPM6 knockouts, hetgeen niet overeenkomt met de tabel in DAP2. Ontwikkelen RRAGD-muizen in uw setting mogelijk cysteuze afwijkingen in hun nieren en hoe interfereert dat met uw onderzoek?

Antwoord 10: De achtergrond van het project proposal is sterk uitgebreid zodat alle eiwitten en farmacologische interventies worden beschreven. We hadden inderdaad in eerste instantie in de sectie 3.4.1 van de project proposal foutief vermeld dat de farmaca alleen aan de

genotypes RRAGD en TRPM6 worden toegediend en hebben dit aangepast. We hebben een graphical abstract toegevoegd met deze informatie samengevat. Kort gezegd hebben we gekozen om farmaca alleen toe te passen op de genotypes waar deze relevant voor zijn.

Zo is bekend dat glucose, insuline en EGF erg belangrijk zijn voor de regulatie van TRPM6, en zullen deze enkel voor dit genotype worden gebruikt. Verder is bekend dat dit proces via mTORC1 verloopt (wat kan worden geremd met rapamycin). RRAGD grijpt ook aan op mTORC1 en daarom zal rapamycin ook op dit genotype worden gebruikt. Aangezien SGLT2 inhibitors waarschijnlijk voor een verhoging van magnesium opname zorgen worden deze getest op RRAGD en TRPM6 (beiden belangrijk voor magnesium opname) en niet op CNNM2 en SLC41A3 (belangrijk voor magnesium extrusie). Zowel ATP productie (te remmen met Oligomycin) en Na⁺ (opname te remmen met Furosemide/Thiazide) zijn belangrijk voor de volledige magnesium reabsorptie en worden daarom op alle genotypes getest. Al deze informatie is nu geïncorporeerd in de tekst in de verschillende secties en de graphical abstract van het proposal en staat beschreven onder antwoord 1.

Er zijn tot op heden nog geen cysteuze afwijking gezien in de RRAGD muizen en hebben er dus geen enkele reden voor dat die in dit experiment niet zullen ontstaan.

*-3.4.1: Uit de DAP blijkt dat er ook additionele kleurstoffen (voor mitochondriële functie, metabole regulatie, pH etc.) gebruikt zullen worden. Dit is niet vermeld en niet onderbouwd in de strategie. Beoogt u via mitochondriële beïnvloeding ATP-niveaus te manipuleren?
Antwoord 11: De additionele kleurstoffen dienen voor twee verschillende doelen. Allereerst en meest belangrijk zullen we gebruik maken van de contrast-kleurstof Alexa Fluor 680-conjugated albumin. Deze kleurstof is belangrijk voor twee verschillende zaken. Allereerst is het belangrijk om te controleren voor de hoeveelheid kleurstof die de DCT bereikt. Aangezien we een enkele bolus van de kleurstoffen geven, zal deze hoeveelheid door de tijd variëren op de te meten plekken. Door een kleurstof in te spuiten waarvan we weten dat deze niet door de DCT zal worden gereabsorbeerd (Albumin), kunnen we met goede zekerheid zeggen hoe het verloop van de hoeveelheid kleurstoffen door de tijd verloopt. Doordat veel Albumin reabsorptie al voor de DCT plaatsvindt, kunnen we het albumin signaal ook gebruiken om te bepalen wat de distale en proximale tubulus segmenten zijn. Dit is nu in detail in antwoord 4 beschreven. Verder hebben we de sectie in 3.2.1 (zie hieronder) aangepast zodat het nu duidelijker is dat we gebruik maken van additionele contrast agents.*

Verder zullen we inderdaad kleurstoffen gebruiken om metabole/mitochondriële functie te monitoren, waar dat technisch mogelijk is, nadat we metabole interventies uitvoeren. Zoals in opmerking 11 aangegeven, zijn wij inderdaad van plan om ATP-niveaus te beïnvloeden door middel van de ATP synthase remmer oligomycin. Deze ATP-niveaus zijn namelijk belangrijk voor de functie van een aantal verschillende eiwitten die we onderzoeken in DAP2 binnen de cel omdat, en zijn ook belangrijk voor het verwerven van Na⁺ gradiënt d.m.v. de Na⁺/K⁺-ATPase. We hebben nu in onder andere in antwoord 1 en DAP2 beter beschreven welke verschillende genotypes en verschillende metabole interventies we testen.

-3.4.3: De commissie verzoekt u een titel te kiezen voor elke bijlage die duidelijk maakt welk type experimenten worden uitgevoerd.

Antwoord 12: We hebben de bijlages de volgende titels gegeven:

DAP1: Setup of novel experimental approach to monitor renal tubular magnesium concentrations intravitaly.

DAP2: Use of intravital imaging to study the role of CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6 in renal tubular magnesium reabsorption.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A1: Waar wordt de fluorescente kleurstof ingespoten (i.v., i.p., etc.), en hoe komt deze stof (u vermeldt dat deze niet kan doordringen in cellen) via een aantal celbarrières (glomerulaire paden, bloedvat-endotheel, tubulus-epitheel) in voldoende concentratie op de plaats waar u het magnesiumgehalte wilt meten? Zou de uiteindelijke concentratie van de fluorescente kleurstoffen uw meetwaardes kunnen beïnvloeden?

Antwoord 13: Hoogstwaarschijnlijk zal de kleurstof i.v. worden geïnjecteerd, maar de beste route van kleurstof-injectie wordt momenteel bepaald door onze partner het ██████████ lab in Californië. Dit hebben we nu beter beschreven onder antwoord 7. De kleurstof kan inderdaad niet worden opgenomen in cellen maar zal via het bloed worden gefilterd door de glomeruli. Hier zorgt de van nature aanwezige concentrerende werking van de niertubulus voor een hoge concentratie van de kleurstof in de DCT. Dit wordt nu in detail beschreven in antwoord 4 met een voorbeeld van pilot-data waarin wordt aangetoond dat het inderdaad in voldoende concentraties in de DCT terecht komt. De uiteindelijke lokale concentratie zal variabel zijn en daarom maken wij ook gebruik van een contrast-kleurstof (Alexa Fluor 680-conjugated albumin) waarbij we kunnen corrigeren voor de lading van de kleurstof. Dit is dus belangrijk om te weten dat de verschillen die we meten niet door verschillen in de hoeveelheid kleurstof komen. Dit is onder andere beschreven in antwoord 11. Tussen verschillende dieren en tussen verschillende nefronen binnen een dier zal ook variatie zijn met betrekking tot de hoeveelheid aanwezige kleurstof, maar omdat we gepaarde metingen binnen specifieke segmenten doen is dat geen probleem.

-A1: EDTA vangt niet alleen Mg^{2+} - ionen weg, maar ook andere ionen (H^+ , Na^+ , Ca^{2+}). Waar dient u de EDTA toe, en in hoeverre kan dit (indirect) interfereren met de magnesiumhuishouding?

Antwoord 14: Zie antwoord 2 voor een uitgebreide toelichting op deze vraag.

-A2: Na afloop van de experimenten zal urine en bloed van de dieren verzameld worden. Welke ionen zult u daarin bepalen en hoe? Is deze methode geschikt wanneer uw monsters EDTA bevatten?

Antwoord 15: Deze methode is inderdaad niet geschikt voor de dieren die EDTA hebben gekregen en heeft weinig toegevoegde waarde voor ons experiment. Na zorgvuldige afweging hebben we besloten geen urine en bloed meer te verzamelen in DAP1. We hebben de volgende tekst daarom aangepast

-A3: Is het aannemelijk dat het KIW ontstoken kan raken tijdens de terminale proef (4 uur vanaf de operatie tot doden van de muis)?

Antwoord 16: Vanuit de pilot-experimenten die onze partner al heeft uitgevoerd zijn geen aanwijzingen dat dit het geval is. De onderzoeker dit het experiment in het Radboud zal gaan uitvoeren zal uitvoerig worden getraind door onze partner zodat hij bekend wordt met de procedure voordat het voorgestelde onderzoek van start gaat.

-A3: Het is niet duidelijk wat er in de drie groepen wordt onderzocht: verschillende kleurstoffen, of het effect van verschillende Mg^{2+} - concentraties.

Antwoord 17: Dit zullen verschillende magnesium concentraties zijn. Dit is nu veranderd in de tekst en uitgebreid beschreven in antwoord 7.

*DAP2

-A2: Zou u hier duidelijker willen beschrijven of het om validatie-experimenten gaat, of dat u nieuwe onderzoeksvragen zult onderzoeken?

Antwoord 18: Het gaat hierbij om nieuwe onderzoeksvragen. Dit is nu ook beter geïntroduceerd in de background van het project proposal (antwoord 1). Verder hebben we de volgende tekst aangepast

-A: Eventueel ongerief als gevolg van het fenotype van de homozygote (en heterozygote?) knockouts is niet genoemd, en is waarschijnlijk ook niet aan de orde in deze proeven (jonge dieren, terminale proef). Zou u hier willen benoemen of het een fok met ongerief betreft? Zo ja, vindt deze fok onder een andere vergunning plaats?

Antwoord 19: Alle diermodellen hebben een fok zonder ongerief. We hebben onder aan sectie A2 een zin toegevoegd die dit beschrijft: A2:

Niet-technische samenvatting:

-U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord 20: Wij zijn dit nagegaan en hebben veranderingen aangebracht. Wij hebben ook tevens opmerking 21, 22 en 23 direct toegepast.

-De tekst is nog niet overal toegespitst op de doelgroep (bevat nog jargon of ingewikkelde termen).

Antwoord 21: We hebben het jargon verwijderd. Zie antwoord 20.

-Het doel van het project is erg compact beschreven bij 'objectives'. Magnesium wordt hier zelfs niet genoemd. Als er een fundamenteel wetenschappelijk doel is (zie de kwestie bij 'Algemeen' in deze brief) dan dient dat hier vermeld te worden.

Antwoord 22: We hebben het doel vermeld en verduidelijkt. Zie antwoord 20.

-De tekst bij het onderdeel 'Replacement' is nu niet begrijpelijk voor de doelgroep.

Antwoord 23: We hebben deze sectie herschreven. Zie antwoord 20.

-Het totaal aantal dieren komt niet overeen met de aantallen in de DAPs.

Antwoord 24: Wij hebben het aantal dieren nagerekend en dit komt overeen met het aantal dieren in de DAPs. $35+144+192+144+264=779$. We hebben echter gezien dat we een foutief totaal in de tabel van DAP2 hadden vermeld. Deze tabel is nu aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze basaal wetenschappelijke aanvraag richt zich op het meten van Mg^{2+} heropname in de nier van muizen met behulp van multi-foton microscopie (MPM). Elektrolyt homeostase is belangrijk voor een organisme. De uitscheiding van Mg^{2+} in de urine is daarom sterk gereguleerd. Hypomagnesemie wordt meestal veroorzaakt door een defect in heropname uit voorurine in de distale tubuli in de nier (DCT). Door recente ontwikkelingen is het inmiddels mogelijk om microscopische beelden te verkrijgen van niertubuli van levende dieren. Dit project richt zich op het meten van intra-luminale Mg^{2+} concentraties, en het bepalen van de invloed van bepaalde cellulaire eiwitten en farmaca daarop. Het project start met de implementatie van het elders ontwikkelde muismodel voor MPM metingen met behulp van een nier-imagingraam en een Mg^{2+} specifieke fluorescente kleurstof. Vervolgens wordt met dit model de rol van CNNM2, RRAGD, SLC41A3 en TRPM6 onderzocht met behulp van genetisch gewijzigde dieren die één van deze eiwitten niet tot expressie brengen. Tenslotte wordt de invloed van bepaalde factoren (metabolisme, mTOR pathway) op Mg^{2+} heropname bepaald, waarbij op logische wijze verschillende genetisch gewijzigde dieren worden ingezet. De commissie constateert op grond daarvan dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De voorgestelde subdoelen volgen elkaar logisch op, en geven een indruk van de bruikbaarheid van de techniek voor het meten van intraluminale Mg^{2+} concentraties, en van de rol van verschillende eiwitten en cascades die betrokken zijn bij de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is tweeledig: het implementeren van een innovatieve ion reabsorptie meting, gebaseerd op fluorescentie, bij muizen, en het bestuderen van de rol van verschillende eiwitten en cascades betrokken bij de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie bij (genetisch gewijzigde) muizen. Het uiteindelijke doel is te begrijpen hoe Mg^{2+} reabsorptie in de DCT wordt gereguleerd. *In vivo* reabsorptie van elektrolyten werd vooral bestudeerd door het analyseren van urine verzameld in metabole kooien. De relatieve bijdrage van verschillen delen van de nier bleef echter onduidelijk, en het was lastig om onderscheid te maken tussen primaire defecten en compensatoire mechanismen. Met de voorgestelde techniek kan bij (genetisch gewijzigde) dieren op verschillende plaatsen in de nier(tubuli) de Mg^{2+} concentratie bepaald worden. Na een vraag van de DEC hierover heeft de aanvrager toegelicht hoe die bepaling wordt gedaan. Ook is het doel van het onderzoek verduidelijkt: het betreft niet alleen validatie van een nieuw muismodel voor meting van Mg^{2+} concentraties in tubuli, maar ook basaal onderzoek naar moleculen betrokken bij Mg^{2+} reabsorptie in tubuli. Door toediening van specifieke farmaca kan

bovendien de invloed van bepaalde cascades daarop bestudeerd worden. Het is aannemelijk dat deze initiële experimenten kunnen leiden tot vervolgonderzoek waarin de rol van meerdere factoren betrokken bij Mg^{2+} reabsorptie in de nier zal worden onderzocht, waardoor uiteindelijk duidelijk wordt hoe dit proces tot stand komt. Er is daarom binnen deze aanvraag een directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van Mg^{2+} reabsorptie in de nier nog zeer beperkt is, en dat deze kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor hypomagnesemie. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers, en de wetenschappelijke gemeenschap (inclusief nefrologen).

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek (terminale experimenten) gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

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

Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot het beschikbaar komen van een nieuwe techniek om nierfysiologie te onderzoeken. Het in deze projectaanvraag beschreven onderzoek zal kennis opleveren over de rol van CNNM2, RRGD, SLC41A3 en TRPM6 in de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie, en de invloed van metabolisme en bepaalde cascades daarop. Het is aannemelijk dat het onderzoek zal aanzetten tot vervolgonderzoek over regulatie van Mg^{2+} reabsorptie in de nier. Kunnen beschikken over meer kennis over de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie in de nier, is van belang voor het ontwikkelen van nieuwe behandelstrategieën voor hypomagnesemie.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de bewering van de aanvrager dat er geen nadelige effecten voor het milieu te verwachten zijn, in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. Er is een intensieve samenwerking met een externe onderzoeker die expert is op het gebied van *in vivo* MPM. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met nierfysiologisch onderzoek en relevante knock-out muismodellen. Het onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan (zie C1 en C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en er is intensieve samenwerking met experts op het gebied van MPM. Na een vraag van de DEC over de reikwijdte van het project, is beter afgebakend wat er in

deze vergunningaanvraag zal worden onderzocht. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is 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 richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door experimenten onder anesthesie, waarna de dieren gedood worden (onder dezelfde anesthesie). De inschatting dat alle dieren terminaal ongerief zullen ondergaan is daarom logisch en navolgbaar.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. Bij veel dieren is sprake van een genetische wijziging, waardoor zij een eiwit, dat is betrokken bij Mg^{2+} reabsorptie, niet tot expressie brengen. Het dier merkt daar zelf weinig tot niets van.
13. De onderzoeker verwacht niet dat zich omstandigheden zullen voordoen waarin het toepassen van een humaan eindpunt is geïndiceerd om onnodig lijden van dieren te voorkomen. Gezien de aard van de experimenten (onder terminale anesthesie) is de commissie het eens met deze inschatting.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Elektrolyt homeostase wordt gereguleerd op inter- en intra-orgaaniveau. Hierdoor is het niet mogelijk om dit te bestuderen met *in vitro* celmodellen of *ex vivo* modellen. Het beschreven nieuwe model maakt *in situ* bepaling van Mg^{2+} niveaus mogelijk, hetgeen unieke informatie oplevert over reabsorptie van Mg^{2+} en onderzoek naar de moleculen en cascades die daar een rol bij spelen faciliteert.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Optimalisatie-experimenten

(betreffende de dosis, toedieningsroute, te gebruiken fluorescente kleurstof) worden uitgevoerd door een samenwerkingspartner in de Verenigde Staten, waardoor er minder variabelen uitgezocht hoeven worden onder deze projectaanvraag. Een fokcoördinator begeleidt de fok van de KO dieren, waardoor een eventueel fokoverschot tot een minimum wordt beperkt. Farmaca worden alleen toegepast op de genotypes (knockouts) waar ze relevant voor zijn.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De experimenten vinden plaats onder terminale anesthesie, verdere verfijning is niet mogelijk. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk omdat de dieren niet in leven kunnen blijven na het experiment (er is een imaging-raam aangebracht op de flank van het dier) en van sommige dieren worden met name de nieren onderzocht voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen dieren gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het ontwikkelen van een innovatieve ion reabsorptie meting, gebaseerd op fluorescentie, bij muizen, en het bestuderen van de rol van verschillende eiwitten en cascades betrokken bij de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie bij (genetisch gewijzigde) muizen het ongerief dat maximaal 779 dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een terminale aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).

Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot het beschikbaar komen van een nieuwe techniek om nierfysiologie te onderzoeken. Het in deze projectaanvraag beschreven onderzoek zal kennis opleveren over de rol van CNNM2, Rragd, SLC41A3 en TRPM6 in de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie, en de invloed van metabolisme en bepaalde cascades daarop. Het is aannemelijk dat het onderzoek zal aanzetten tot vervolgonderzoek over regulatie van Mg^{2+} reabsorptie in de nier, en onderzoek naar de regulatie van andere elektrolyten zoals Na^+ en Ca^{2+} . Kunnen beschikken over meer kennis over de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie in de nier, is van belang voor het ontwikkelen van nieuwe

behandelstrategieën voor hypomagnesemie, en voor begrip van de processen die betrokken zijn bij elektrolythomeostase.

Voor de samenleving is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor hypomagnesemie. Hypomagnesemie is geassocieerd met spierkrampen, diabetes en hypertensie. Meer kennis over moleculen en cascades die betrokken zijn bij Mg^{2+} reabsorptie is van belang voor de ontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën voor hypomagnesemie. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht meer kennis over de processen die een rol spelen bij Mg^{2+} reabsorptie van substantieel belang. Het muismodel kan waarschijnlijk aangepast worden, zodat ook Na^+ en Ca^{2+} niveaus in niertubuli gemeten kunnen worden.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een innovatieve ion reabsorptie meting, gebaseerd op fluorescentie, bij muizen, en het bestuderen van de rol van verschillende eiwitten en cascades betrokken bij de regulatie van Mg^{2+} reabsorptie bij (genetisch gewijzigde) muizen. Het uiteindelijke doel is te begrijpen hoe Mg^{2+} reabsorptie in de DCT wordt gereguleerd.

De DEC is van mening dat de belangen van de wetenschappelijke gemeenschap en uiteindelijk de samenleving voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 19 augustus 2022 10:51
Aan: Postbus instantie voor dierenwelzijn
Onderwerp: Aanhouden AVD10300202215927

Geachte [REDACTED]

Op 17-03-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Intravital imaging of ion reabsorption from tubular lumen" met aanvraagnummer AVD10300202215927. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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

- Kunt u in de NTS bij de potentiële voordelen een onderscheid maken tussen de resultaten en de voordelen die u binnen de looptijd van het project denkt te behalen en die u op de lange termijn voorziet?
- Kunt u in de NTS het wetenschappelijke en/of klinische probleem verhelderen?
- Bij de procedures geeft u aan dat de muizen "enkele" injecties krijgen. Kunt u dit aantal verduidelijken door een range of een maximaal aantal injecties te noemen?
- U noemt bij de gevolgen het gebruik van genetische gemodificeerde dieren met een verlaagde magnesium concentratie in het bloed. Kunt u aangeven of de dieren ongerief ervaringen als gevolg van de verlaagde magnesium concentratie?
- Kunt u, in lijn met de vorige vraag, bij het onderdeel "verfijning" aangeven of er maatregelen worden genomen om eventuele welzijnsaantastingen door een verlaagde magnesium concentratie tot een minimum te beperken?
- Bij de toelichting voor de keuze van de diersoort spreekt u over "lagere diersoorten". Het is mogelijk voor algemene publiek niet duidelijk wat u hiermee bedoeld. Kunt u deze term aanpassen?
- In een aantal van uw antwoorden lijken er stukken tekst gekopieerd waardoor er zinsdelen of zinnen twee keer in staan. Kunt u dit corrigeren?

Onduidelijkheden

Bijlage dierproeven 1

- Onder D. geeft u aan dat de dieren gedurende of na de procedure pijn zullen ervaren. Kunt u dit toelichten?
- Uit uw antwoord onder K. wordt de wetenschappelijke reden van het doden van de dieren niet duidelijk. Kunt u dit toelichten?

Bijlage dierproeven 2

- In de bijlage beschrijft u onder A dat de muizen injecties krijgen met geconcentreerde fysiologische zoutoplossingen (met of zonder magnesium) of met farmacologische stoffen. Kunt u in de bijlage aangeven hoeveel injecties er maximaal worden gegeven?
- Kunt u onder F. de onderbouwing van de ongeriefclassificatie geven?

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 dit bericht 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


www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Datum

24-08-2022

Betreft

DEC2021-0038 / AVD10200 2022 15927

Aanbiedingsbrief met reactie op alle afzonderlijke vragen en opmerkingen

Geachte Centrale Commissie Dierproeven (CCD),

Bedankt voor uw vragen en opmerkingen aangaande het dierexperimenteel project met de titel 'Intravital imaging of ion reabsorption from tubular lumen'. Bijgevoegd vindt u onze reactie op uw vragen en opmerkingen. Wij hebben uitermate zorgvuldig de vragen en opmerkingen bestudeerd, en de veranderde tekst uit iVentionLES en de NTS excel is in deze brief in rood aangegeven. Onveranderde tekst uit iVentionLES is in deze brief in blauw aangegeven. De veranderingen in NTS (zowel in de excel als in iVentionLES) konden niet in rood worden aangegeven dus zijn in de originele kleur doorgevoerd. De andere aanpassingen in iVentionLES hebben we de in de tekst in rood aangegeven.

Wij hopen hierbij uw vragen en opmerkingen naar wens te hebben beantwoord en zien uit naar uw nieuwe beoordeling van onze projectaanvraag.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature block]

Reacties op vragen en opmerkingen

Niet technische samenvatting

Opmerking 1:

Kunt u in de NTS bij de potentiële voordelen een onderscheid maken tussen de resultaten en de voordelen die u binnen de looptijd van het project denkt te behalen en die u op de lange termijn voorziet?

Antwoord 1:

We hebben de onderstaande verandering in de NTS doorgevoerd zodat er een duidelijk onderscheid wordt gemaakt tussen de voordelen binnen de looptijd van dit project en op de lange termijn:

Nieuwe tekst: "Tijdens de looptijd van het project komt er een zeer waardevolle techniek beschikbaar waardoor magnesiumopname in de nier in levende dieren kan worden bestudeerd. Daarnaast zal tijdens de looptijd van het project al extra kennis worden vergaard waardoor we de werking van de magnesiumopname in de nier beter zullen begrijpen. Deze kennis zal in op de lange termijn vervolgens bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor patiënten met verstoringen in bloed-magnesium waardes."

Opmerking 2:

Kunt u in de NTS het wetenschappelijke en/of klinische probleem verhelderen?

Antwoord 2:

We hebben in de sectie "Doelstellingen van het project/Objectives of the project" een inleidende alinea toegevoegd die het wetenschappelijke en/of klinische probleem als volgt verheldert:

Nieuwe tekst: "Magnesium is een belangrijke voedingsstof voor het functioneren van het menselijk lichaam. De hoeveelheid magnesium wordt nauwkeurig gereguleerd, waarbij de nier bepaalt hoeveel magnesium via de urine wordt uitgescheiden en hoeveel er in het lichaam wordt vastgehouden. Bij sommige ziekten is deze regulatie verstoord en wordt er te weinig magnesium vastgehouden door het lichaam. Omdat het momenteel onmogelijk is om deze regulatie in levende organismen te bekijken, mist er momenteel belangrijke kennis over hoe de nier ervoor zorgt dat de juiste hoeveelheid magnesium uitgescheiden en vastgehouden wordt. Deze kennis is niet alleen nodig om te begrijpen hoe de nier precies functioneert, maar ook om nieuwe aangrijpingsmechanisme te kunnen identificeren voor toekomstige therapieën die de opname van magnesium stimuleren.

Er zijn drie belangrijke doelen van dit onderzoek. Ten eerste willen we een techniek ontwikkelen die het mogelijk maakt om magnesium heropname in de nier in levende dieren te meten, iets dat nu nog niet mogelijk is. Verder willen we graag bepalen hoe de magnesium heropname in de nier aangedaan is als functie van belangrijke eiwitten in dit proces verstoord zijn. Als laatste willen we de functie van deze eiwitten in detail bestuderen door een aantal belangrijke processen te manipuleren waarvan bekend is dat deze van invloed zijn op de functie van deze eiwitten."

Opmerking 3:

Bij de procedures geeft u aan dat de muizen “enkele” injecties krijgen. Kunt u dit aantal verduidelijken door een range of een maximaal aantal injecties te noemen?

Antwoord 3:

We hebben de tekst nu aangepast waardoor het maximaal aantal injecties verduidelijkt is.

Nieuwe tekst: “De dieren worden gebruikt om door middel van een microscoop te kijken hoe magnesium heropname in de nier daadwerkelijk plaatsvindt. Daarvoor wordt operationeel een hulpstuk aangebracht op de nier van de muis en worden maximaal 4 injecties gedaan (alles onder volledige verdoving). Deze injecties bevatten onder andere stoffen om magnesium zichtbaar te maken, en bijvoorbeeld een hoge concentratie magnesium.”

Opmerking 4:

U noemt bij de gevolgen het gebruik van genetische gemodificeerde dieren met een verlaagde magnesium concentratie in het bloed. Kunt u aangeven of de dieren ongerief ervaringen als gevolg van de verlaagde magnesium concentratie?

Antwoord 4:

Wij hebben eerder met deze dieren gewerkt en de genetisch gemodificeerde dieren die wij hebben opgenomen in dit voorstel hebben geen ongerief als gevolg van de verlaagde magnesium concentratie. We hebben de volgende zin toegevoegd bij de gevolgen:

Nieuwe tekst: “De dieren worden bij aanvang van het experiment onder verdoving gebracht en zullen daar niet meer wakker van worden. Alle injecties en operationele procedures worden dus onder verdoving uitgevoerd. Een aantal dieren hebben een aanpassing in hun DNA waardoor zij mogelijk een verlaagde magnesium concentratie in het bloed hebben. Van deze dieren is het bekend dat zij geen ongerief ervaren als gevolg van deze verlaagde magnesium concentratie”

Opmerking 5:

Kunt u, in lijn met de vorige vraag, bij het onderdeel “verfijning” aangeven of er maatregelen worden genomen om eventuele welzijnsaantastingen door een verlaagde magnesium concentratie tot een minimum te beperken?

Antwoord 5:

Wij hebben eerder met deze dieren gewerkt en de genetisch gemodificeerde dieren die wij hebben opgenomen in dit voorstel hebben geen ongerief als gevolg van de verlaagde magnesium concentratie. We hebben de volgende zin toegevoegd bij de verfijning:

Nieuwe tekst: “De dieren met een aanpassing in hun DNA, die zijn opgenomen in dit voorstel, ervaren geen ongerief door de mogelijk verlaagde magnesium concentraties in het bloed. Alle handelingen, in zowel de dieren met als zonder aanpassingen in hun DNA, zullen plaatsvinden onder volledige verdoving, zodat er zo min mogelijk ongerief voor de muizen is.”

Opmerking 6:

Bij de toelichting voor de keuze van de diersoort spreekt u over “lagere diersoorten”. Het is mogelijk voor algemene publiek niet duidelijk wat u hiermee bedoeld. Kunt u deze term aanpassen?

Antwoord 6:

Om de term “lagere diersoorten” te vervangen hebben we een stuk tekst in de toelichting van de diersoort herschreven:

Nieuwe tekst: “Voor dit onderzoek is het van groot belang dat de communicatie tussen verschillende onderdelen van de nier, en de communicatie tussen de nier en andere organen in ons onderzoek zo representatief mogelijk is voor de mens. Om deze reden kunnen we geen gebruik maken van diersoorten waarbij deze orgaanindeling duidelijk anders is dan bij de mens. Daarom maken we gebruik van muizen, waarvan bekend is dat deze communicatie binnen en buiten de nier vergelijkbaar is met de mens. Er wordt gebruik gemaakt van volwassen muizen omdat hierbij de nieren volledig ontwikkeld zijn. Tussen mannetjes en vrouwtjes wordt geen onderscheid gemaakt, deze worden beiden geïncorporeerd.”

Opmerking 7:

In een aantal van uw antwoorden lijken er stukken tekst gekopieerd waardoor er zinsdelen of zinnen twee keer in staan. Kunt u dit corrigeren?

Antwoord 7:

Onze excuses voor deze slordigheden, deze zijn er nu uitgehaald.

**Onduidelijkheden
Bijlage dierproeven 1**

Opmerking 8:

Onder D. geeft u aan dat de dieren gedurende of na de procedure pijn zullen ervaren. Kunt u dit toelichten?

Antwoord 8:

Dit was inderdaad zo ingevuld met de gedachte dat de procedures pijn konden veroorzaken als de dieren bij bewustzijn waren. Ik heb de vraag of dieren pijn ervaren nu in beide bijlages, na overleg met de lokale IVD, veranderd in ‘No’ omdat de dieren vanaf het begin, en gedurende de gehele procedure onder volledige anesthesie zijn. Verder zullen we de muizen goed monitoren om te voorkomen dat ze tijdens de experimentele procedure ontwaken van de anesthesie. Om die reden heb ik voor beide bijlages de volgende tekst aangepast onder ‘Indicate what relieving methods will be used’

Nieuwe tekst: “Experiments will last one day-part (4 hours) in total, are terminal and are completely performed under complete isoflurane anesthesia. We will monitor the animals closely during the execution of all experiments to prevent animals from waking up from anesthesia.”

Opmerking 9:

Uit uw antwoord onder K. wordt de wetenschappelijke reden van het doden van de dieren niet duidelijk. Kunt u dit toelichten?

Antwoord 9:

We hebben het antwoord onder K nu verder gespecificeerd.

Nieuwe tekst: "Because the microscope needs free access to the kidney, an incision in the skin overlaying the kidney will be made under anesthesia, and a glass coverslip is glued on the kidney. Moreover, injection of potentially harmful compounds is performed during anesthesia. Therefore, mice subjected to these procedures can not make a full recovery, and killing the mice during anesthesia results in the least discomfort."

Bijlage dierproeven 2

Opmerking 10:

In de bijlage beschrijft u onder A dat de muizen injecties krijgen met geconcentreerde fysiologische zoutoplossingen (met of zonder magnesium) of met farmacologische stoffen. Kunt u in de bijlage aangeven hoeveel injecties er maximaal worden gegeven?

Antwoord 10:

We hebben nu gespecificeerd dat er maximaal 4 injecties worden gedaan in bijlage 2 onderdeel A:

Nieuwe tekst: "Follow-up experiments will only be performed if Mg^{2+} flow through the kidney lumen can be monitored with sufficient resolution to be able to quantify Mg^{2+} reabsorption through the tubule (as described in DAP1). The consideration to include follow-up experiments I and II is made for each genotype separately, and follow-up experiments will only be performed for the genotypes that yield sufficient resolution genotype-specific differences in Mg^{2+} flow as measured in the basal experiment. Each individual mouse will receive a maximum of 4 injections."

Opmerking 11:

Kunt u onder F. de onderbouwing van de ongeriefclassificatie geven?

Antwoord 11:

We hebben nu onder F dezelfde onderbouwing gegeven als in bijlage 1:

Nieuwe tekst: "Non-recovery; animals will not wake up from anesthesia."



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10300202215927
Bijlagen
3

Datum 29 augustus 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 maart 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Intravital imaging of ion reabsorption from tubular lumen" met aanvraagnummer AVD10300202215927. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 29 augustus 2022 tot en met 31 maart 2027.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 15 juli 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 19 augustus 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het verhelderen van het doel en de procedures in de NTS en het toelichten van enkele procedures en de ongeriefsclassificatie in de bijlagen dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:
29 augustus 2022
Aanvraagnummer:
AVD10300202215927

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:
29 augustus 2022
Aanvraagnummer:
AVD10300202215927

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 augustus 2022 tot en met 31 maart 2027, voor het project "Intravital imaging of ion reabsorption from tubular lumen" met aanvraagnummer AVD10300202215927, na advies van dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 17 maart 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 15 juli 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Setup of novel experimental approach to monitor renal tubular magnesium concentrations intravitaly., zoals ontvangen op 15 juli 2022;
 - 3.4.3.2 Use of intravital imaging to study the role of CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6 in renal tubular magnesium reabsorption., zoals ontvangen op 15 juli 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 15 juli 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 15 juli 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 24 augustus 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Setup of novel experimental approach to monitor renal tubular magnesium concentrations intravitaly.			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL6/n	35	100,0% Terminaal
3.4.3.2 Use of intravital imaging to study the role of CNNM2, RRAGD, SLC41A3, and TRPM6 in renal tubular magnesium reabsorption.			
	Muizen (Mus musculus) / CNNM2	144	100,0% Terminaal
	Muizen (Mus musculus) / RRAGD	192	100,0% Terminaal
	Muizen (Mus musculus) / SLC41A3	144	100,0% Terminaal
	Muizen (Mus musculus) / TRPM6	264	100,0% Terminaal

Aanvraagnummer: AVD10300202215927

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid 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:
AVD10300202215927

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

In artikel 9 van de wet 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

Aanvraagnummer:
AVD10300202215927

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

De NTS van dit project staat gepubliceerd op de website van de EU:

<https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/web/resources/alures/submission/nts/list>

U kunt de NTS het makkelijkste vinden door op de Nederlandse titel te zoeken. De samenvattingen op deze website hebben een Europees volgnummer welke verschilt van het Nederlandse NTS-nummer. Voor meer informatie over de NTS en een lijst met zowel de Nederlandse als Europese volgnummers gaat u naar deze pagina op de website van de CCD:

<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/onderwerpen/themas/niet-technische-samenvattingen>

The NTS of this project is published on the website of the EU and can be found here:

<https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/web/resources/alures/submission/nts/list>

The easiest way to find the NTS is to search on the Dutch title. The summaries on this website are indicated with their European serial number, which is different from the Dutch NTS number.

You can find more information about the NTS and a list with the Dutch NTS numbers and their corresponding European counterparts on the website of the CCD:

<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/onderwerpen/themas/niet-technische-samenvattingen>