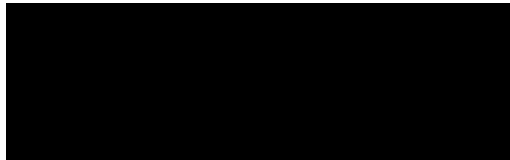




> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
wob-ccd@rvo.nl

**Onze referentie**  
B.2.16.026

**Uw referentie**  
[REDACTED]

**Briefkenmerk**  
CCD-2017-126

**Bijlage**  
1

Datum **04 MEI 2017**  
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.16.026 (W16-10S)

Geachte heer [REDACTED],

Bij brief van 4 oktober 2016, ontvangen op 5 oktober 2016, heeft u een bezwaarschrift (uw kenmerk 2016/154) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 1 september 2016 met kenmerk W16-10S.

**Beslissing**

Het bestuur van de CCD verklaart uw bezwaren gedeeltelijk gegrond. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur tot deze beslissing is gekomen.

**Opschorting en verdaging**

Bij brief van 13 oktober 2016 hebben wij de ontvangst van uw bezwaarschrift bevestigd. Op 21 november 2016 is vervolgens de beslistermijn verdaagd en/of opgeschort. In deze brief hebben wij opgenomen in welke situaties de beslistermijn kan worden verlengd.

In uw bezwaarschrift is gesteld dat het niet mogelijk is "*een, op documenten toegesneden bezwaar te formuleren.*" Wij informeerden u bij onze brief van 19 oktober 2016 dat de bij het Wob-verzoek gevraagde documenten binnen een aantal dagen op onze website geplaatst worden. Op 24 oktober 2016 hebben wij de gevraagde documenten op onze website geplaatst.

Wij hebben van u geen aanvullende bezwaargronden ontvangen. Bij e-mail van 16 maart 2017 hebben wij u hiervoor tot en met 30 maart 2017 gelegenheid gegeven. U heeft hiervan geen, althans niet tijdig, gebruik gemaakt.

**Verloop van de procedure**

Op 13 april 2016 heeft u per e-mail, op grond van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: de Wob), verzocht om toezending van documenten die betrekking hebben op zes verschillende vergunningaanvragen. Voor een

opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek en het bestreden besluit.

Bij besluit van 1 september 2016 is beslist op het Wob-verzoek.

Bij brief van 4 oktober 2016 heeft u tegen het besluit een bezwaarschrift ingediend, waarvan de ontvangst bij brief van 13 oktober 2016 bevestigd is.

Op 4 april 2017 heeft een hoorzitting plaatsgevonden waarvoor u bent uitgenodigd voor het geven van een toelichting op ingenomen standpunten. Derde belanghebbenden hebben geen gebruik gemaakt van hun gelegenheid gehoord te worden.

Op 16 maart 2017 bent u nogmaals geïnformeerd dat de stukken vanaf eind 2016 gepubliceerd zijn op de site van de CCD en dat u of uw cliënte hierover destijds is geïnformeerd. In uw bezwaarschrift stelt u dat hij in verband met het ontbreken van de opgevraagde documenten geen volledige bezwaargronden kon aanvoeren. Bovenstaande berichten hebben echter niet geleid tot aanvullende bezwaargronden. Per email van 16 maart 2017 is u aangegeven dat u indien u uw bezwaar wenst aan te vullen, dat kan tot en met 30 maart 2017. Ruim voor deze datum zijn de geanonimiseerde zienswijzen verstrekt. Vaststaat dat voor afloop van deze termijn geen aanvullende gronden zijn ontvangen.

Tijdens de hoorzitting heeft u een aanzienlijk aantal nieuwe en op specifieke documenten toegespitste bezwaargronden aangevoerd. Gesteld wordt dat met het zodanig laat kenbaar maken van nieuwe argumenten derde belanghebbenden worden belemmerd om daarop adequaat te reageren en de goede voortgang van de procedure daardoor is belemmerd. Uw handelswijze wekt bovendien op zijn minst de indruk dat deze bedoeld is om de besluitvorming te vertragen, zodat deze een dwangsom verbeurt. De gemachtigde is immers in verband met een ingediend beroep niet tijdig beslissen rechtstreeks gebaat bij het verbeuren van de dwangsommen.

#### **Ten aanzien van de ontvankelijkheid**

Het bezwaar richt zich tot het besluit van 1 september 2016. Uw bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

#### **Derde belanghebbenden**

De derde belanghebbenden zijn gevraagd om een zienswijze. Bij de behandeling van de bezwaren zijn derde belanghebbenden nogmaals in de gelegenheid gesteld aanvulling te geven op de eerder ingediende zienswijze en te reageren op uw bezwaargronden. Deze zienswijzen is aan u voor de hoorzitting anoniem, verbonden aan een uniek NTS nummer, verstrekt.

#### **Bezwaren**

Hieronder worden uw bezwaargronden kort toegelicht.



Uw bezwaren zien toe op meerdere punten. Allereerst is aangegeven dat de data van vergaderingen van de CCD niet kunnen worden geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob (hierna: **bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het niet kenbaar maken van de weigerings- of uitzonderingsgronden per specifieke passage (hierna: **bezwaar 2**).

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (hierna: **bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme (hierna: **bezwaar 4**). Gedurende de bezwarenhoorzitting heeft u voor het eerst de volgende bezwaren aangedragen. De weigeringsgronden onevenredige benadeling en/of bedrijfs- en fabricagegegevens en zijn niet goed toegepast. Tevens stelt u dat twee aanvragen te ruim zijn gelakt (hierna: **bezwaar 5**).

#### **Ten aanzien van de gronden**

##### **Ten aanzien van bezwaar 1**

Deze grond slaagt.

U heeft aangegeven dat data van vergaderingen ten onrechte zijn geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Dergelijke data van vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen. Ook de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen is geen persoonlijke beleidsopvatting.

Tijdens de hoorzitting op 4 april 2017 heeft u aangegeven dat het onderhavige Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de aanvragers en de CCD. Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat de data van vergaderingen onderdeel uitmaken van het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD. Het complete document is geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Data van vergaderingen van de CCD kunnen echter niet worden gezien als persoonlijke beleidsopvattingen ten behoeve van intern beraad. De data van vergaderingen worden middels dit besluit alsnog niet geopenbaard, omdat de data reeds openbaar zijn middels de verslagen van de vergaderingen van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD, via (onder andere) de zoekterm 'verslag'.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond.

##### **Ten aanzien van bezwaar 2**

Deze grond slaagt niet.

Bij het besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob verzoek. De documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) zijn toegepast.

Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016, ECLI:NL:RBAMS:2016:9336.

Voor wat betreft de weggelakte persoonsgegevens kan gelet op onder meer de opbouw en context van de documenten worden opgemaakt om wat voor soort gegevens het gaat. Daaruit kan worden afgeleid dat de persoonsgegevens en de hiertoe herleidbare informatie zijn geweigerd op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder e van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van onevenredige benadeling. Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het advies aan het bestuur volledig is geweigerd op grond van artikel 11 Wob.

Bij enkele in het besluit genoemde documenten is informatie geweigerd op alleen de weigeringsgrond onevenredige benadeling. Ook dit volgt uit het besluit.

Het is dus zonder meer duidelijk op grond van welke uitzonderingsgrond geweigerd is een bepaalde passage of zinsnede openbaar te maken.

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij ieder NTS-nummer vergelijkbaar. Meerdere documenten betreffen formulieren of zijn opgemaakt in een vaste opbouw, zodat het per document motiveren van de weigeringsgrond zou leiden tot herhaling hetgeen geen doel dient. Dit geldt ook in het geval het niet gaat om geheel gelijksoortige documenten. Verwezen wordt naar rechtsoverweging 3.2 van de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 2 september 2015, ECLI:NL:RVS:2015:2779.

### **Ten aanzien van bezwaar 3**

Deze grond slaagt deels.

In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – volstrekt niet inzichtelijk zijn. Volgens u wordt slechts aangegeven wat de vergunninghouders in hun zienswijzen hebben gesteld, maar wordt niet aangegeven wat de CCD hierover besluit.

De CCD is van oordeel dat in het besluit de zienswijzen van derde belanghebbenden zijn opgenomen en dat hierop niet in alle gevallen direct een reactie van de CCD is gekomen. Uit de context van het besluit in samenhang met de inventaris per projectvergunning, waarin is aangegeven of informatie in





bepaalde documenten is geopenbaard of (deels) is geweigerd, valt echter af te leiden om welke reden bepaalde informatie is geweigerd.

In enkele gevallen is dit echter niet specifiek door de CCD benoemd. Middels dit besluit wordt derhalve alsnog gemotiveerd waarom bepaalde informatie wel of niet wordt geweigerd.

Verwezen wordt naar de behandeling van de bezwaren onder 5.

#### **Ten aanzien van bezwaar 4**

Deze grond slaagt niet.

In uw bezwaarschrift wordt gesteld dat met de weigering op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer (artikel 10 lid 2 sub e Wob) vanwege dreiging van dierenrechtenactivisme voorbij wordt gegaan aan het jaarverslag van de AIVD over 2015 waarin staat dat dierenrechtenextremisme een teruglopend fenomeen is en dat het nu alleen nog vreedzame acties en demonstraties zijn. U stelt dat de CCD dit niet kan beoordelen en verzoekt de gegevens alsnog openbaar te maken.

In tegenstelling tot deze bezwaargrond is bij de behandeling van het bestreden besluit uitgegaan van het op dat moment beschikbare meest recente AIVD jaarverslag en DTN van de NCTV. In het bezwaarschrift verwijst u slechts naar de voorgaande versies.

In de memorie van toelichting (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) wordt benadrukt dat ook tot personen herleidbare gegevens onder de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kunnen vallen. Daarbij is in de memorie van toelichting aangehaald dat: *“het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaar moet wegen.”*

Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme<sup>1</sup>. In het recente verleden zijn daar veel voorbeelden van geweest. Uit vaste rechtspraak volgt dat dat ook bij de Wob een terugkerend onderwerp is.

Binnen de context van de opgevraagde documenten bestaat de vrees voor gevaar voor de persoonlijke levenssfeer en dat personen betrokken bij dierproeven als gevolg van de openbaarmaking overmatig en mogelijk ook gewelddadig zullen worden benaderd door dierenrechtenactivisten. De incidenten die zich in het verleden hebben voorgedaan bevestigen dat een kleine groep mensen een reëel risico kan vormen en de vrees voor acties van dierenrechtenactivisten gerechtvaardigd is. Verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank van Midden-Nederland van 8 augustus 2016, zaaknummers UTR 15/3008 en UTR

---

<sup>1</sup> Blz. 14 Memorie van Toelichting Wet op de dierproeven

15/3727. Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat,

blijkt in de eerste plaats uit de uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart jl. (ECLI:NL:RVS:2017:680) en 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

De Afdeling stelt dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Van belang is verder dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. Dit is benadelend voor de betrokken personen. De CCD zal de namen van personen en alle daar direct of indirect naar herleidbare gegevens blijven weigeren.

De CCD is van oordeel dat de afweging tot het wel of niet openbaar maken van persoonsgegevens een geheel andere is dan het weigeren van namen van vergunninghouders. Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van bedrijfsnamen van vergunninghouders versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel andere aard en kent ook een ander gewicht. De hierboven genoemde overwegingen geven op zijn minst aanleiding een zwaarder gewicht toe te kennen aan de belangen van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

Het belang van weigering van persoonsgegevens en tot persoonsgegevens herleidbare informatie weegt op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaarder dan het publiek belang van openbaar maken van deze informatie.

#### **Ten aanzien van bezwaar 5**

Deze grond slaagt deels.

Ten aanzien van NTS 2015282, 2015285 stelt u dat delen van de onderzoeksopzet ten onrechte zijn geweigerd, waaronder de namen van stoffen en middelen. In documenten behorende bij 2015286 is ten onrechte de achtergrond van het onderzoek geweigerd en is tevens een omschrijving van de muizen geweigerd, In de vergunningen 2015310 en 2016418 zijn passages in de aanvraag volgens



gemachtigde van Wob verzoeker te ruim gelakt. NTS nummer: 2015284 noemt u niet.

**NTS:2015282**

Ten aanzien van vergunning 2015282 is informatie geweigerd op basis van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, waarbij zowel sprake is van namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen als van concurrentiegevoelige informatie. Daar waar sprake is van weigering vanwege concurrentiegevoelige informatie zal hierop worden ingegaan. In het bestreden besluit is aansluiting gezocht bij de zienswijzen van de belanghebbenden en middels dit besluit zal het oordeel van de CCD duidelijker naar voren worden gebracht.

De eerste weigering uit document 2 is geweigerd vanwege de directe herleidbaarheid naar eerder onderzoek, zodat de namen van het onderzoeksteam op eenvoudige wijze zijn te achterhalen.

In document zes staat op bladzijde 2 het woord "reference". Dit woord wordt wel geopenbaard, zodat verzoeker kan nagaan welke informatie het betreft. De referentie zelf wordt vanwege directe herleidbaarheid naar het onderzoeksteam wel geweigerd. Dit laatste geldt tevens voor de op bladzijde 4 van document 10 opgenomen eerste regel met referenties.

Ten aanzien van de geweigerde delen uit de documenten 2, 4, 6, 7, 8, 9, 13 en 16 (vergunningdeel) is aansluiting gezocht bij de ingekomen zienswijze van vergunninghouder. Aanvullend aan de overwegingen in het bestreden besluit wordt gesteld dat de geweigerde informatie inzicht geeft in de onderzoeksopzet. Daaruit kan opgemaakt worden uit welke stappen het onderzoek bestaat en hoe vergunninghouder tot de keuze van die stappen is gekomen. Dit geeft inzicht in de afwegingen van vergunninghouder op belangrijke punten en in de wijze van totstandkoming van het proces. Deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare of identieke situatie. De CCD verwijst naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015, ECLI:NL:RBNNE:2015:4811, waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als concurrentiegevoelig en als gevolg daarvan geweigerd op grond van onevenredige benadeling.

Het belang de voornoemde informatie te weigeren wordt vergroot door het feit dat het onderzoek zich thans in de beginfase bevindt. In deze fase is het voor de concurrentie eenvoudiger te profiteren van de openbaar gemaakte informatie van vergunninghouder, omdat bekend is dat de voorsprong van vergunninghouder beperkt is. Met het openbaar maken van de geweigerde informatie is het zeer waarschijnlijk dat concurrenten met een grotere capaciteit op eenvoudige wijze deze achterstand kunnen inlopen, het geneesmiddel eerder op de markt kunnen brengen en vervolgens met eigendomsrechten beschermen. Dit heeft enorme financiële, commerciële en wetenschappelijke gevolgen.

Met deze aanvullende motivering wordt het woord "reference" in document 6 op bladzijde twee en op bladzijde 4 van document 10 openbaar gemaakt. Voor het overige wordt geen aanleiding gezien meer informatie openbaar te maken.

**NTS:2015285**

Tijdens de bezwarenhoorzitting heeft u gesteld dat delen van de onderzoeksopzet ten onrechte zijn geweigerd, waaronder de namen van stoffen en middelen. Ten aanzien van in de documenten opgenomen beperkt geweigerde informatie wordt verwezen naar hetgeen gesteld is onder NTS 2015282. Aanvullend wordt gesteld dat:

In het besteden besluit is opgenomen dat enkele specifieke termen zijn geweigerd. Deze termen vormen een wezenlijk onderdeel van de proefopzet. In aanvulling hierop wordt gesteld dat deze termen inzicht geven in niet alleen de proefopzet, maar ook de wijze waarop het onderzoek plaatsvindt en in een essentieel detail wat met de proef samenhangt. Deze informatie dient vanuit oogpunt van financiële, commerciële en wetenschappelijke gevolgen geweigerd te worden. De zienswijze van derde belanghebbende wordt ook op dit onderdeel volledig gevolgd. De CCD weigert deze informatie op grond van onevenredige benadeling.

In document 4 is slechts één zin geweigerd, omdat hierin een verwijzing naar de eigen onderzoekers staat. De CCD is van oordeel dat dit niet dient te worden geopenbaard. In document 5 staan samenwerkingen met personen en zijn persoonsgegevens geweigerd. In document 6 en 7 wordt niet het soort (ras) proefdieren geweigerd, maar het geslacht van de dieren. Gebleken is dat er in dit onderzoek een essentieel onderscheid bestaat tussen het gebruik van verschillende geslachten en dat dit belangrijke informatie verschaft over het verdere verloop van de procedure. Om die reden acht de CCD het van belang dat deze informatie geweigerd blijft. Tevens wordt om voornoemde reden het geslacht van de proefdieren in document 8 geweigerd. In dit document wordt tevens een aantal referenties geweigerd, omdat dit referenties naar nog niet gepubliceerd (eigen) onderzoek betreft.

**NTS:2015286**

Voor wat betreft vergunning 2015286 wordt in de documenten 2, 4, 10, 14 en 16 informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Uit het bestreden besluit volgt dat slechts informatie die herleidbaar is tot personen is geweigerd. In document 2 en 14 staan op bladzijde 3 de woorden "references (from own work)". Deze woorden worden wel geopenbaard, zodat verzoeker kan nagaan welke aansluitende informatie wordt geweigerd. De referentie zelf wordt vanwege directe herleidbaarheid naar het onderzoeksteam namelijk geweigerd. Dit laatste geldt tevens voor de op bladzijden 1, 2 en 3 van document 10 opgenomen publicatieverwijzing. In document 4 en 16 zijn twee namen van samenwerkende onderzoekers geweigerd, welke ook middels dit besluit geweigerd blijven (het gaat hier dus niet om soorten proefdieren, wat de tekst in het document wellicht impliceert).



De veronderstelling van gemachtigde van Wob-verzoeker dat in de documenten een omschrijving van de muizen wordt geweigerd, is niet juist. Aangezien in de aanvraag vrijwel geen informatie is geweigerd, kan het niet anders zijn dan dat gemachtigde doelt op de weigeringen in documenten 4 en 16 op bladzijde 3 onderaan. Het betreffen persoonsnamen en hun laboratoria waar zij werkzaam zijn. In het voorliggende project wordt met hen samengewerkt. De zienswijzen van vergunninghouder zijn op dit onderdeel gevolgd. Deze gegevens worden derhalve geweigerd op grond van onevenredige benadeling en eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

**NTS:2015310**

Gesteld wordt dat in de aanvraag passages te ruim gelakt zijn.

Op het aanvraagformulier zijn de persoonsnamen en tot personen te herleiden informatie gelakt. Er zijn geen argumenten aangedragen waarom dit niet juist zou zijn.

In de documenten 2, 4, 5, 6, 10 en 11 wordt informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Het gaat hier om specifieke stoffen die door het gehele onderzoek worden gebruikt en afgeleiden van deze stoffen. De CCD is van oordeel dat in de genoemde documenten voorlopige conclusies worden getrokken die nog niet voor openbaarmaking in aanmerking komen. Voorts zijn enkele (delen van) schema's geweigerd, omdat deze schema's uitgebreid de verschillende stappen van het onderzoek beschrijven en kenmerkend zijn voor de gebruikte onderzoeksstrategie.

Er worden voorlopige conclusies getrokken die nog niet voor openbaarmaking in aanmerking komen. Enkele schema's zijn geweigerd, omdat die uitgebreid de verschillende stappen van het onderzoek beschrijven en kenmerkend zijn voor de gebruikte onderzoeksstrategie. In document 6 wordt een verwijzing naar een bedrijf waarmee wordt samengewerkt geweigerd. In de documenten 10 en 11 worden nagenoeg dezelfde gegevens geweigerd als in document 4 en 5, omdat dit hernieuwde versies zijn van de eerdere bijlagen.

Aanvullend wordt verwezen naar hetgeen gesteld is onder NTS 2015282.

Er bestaat geen aanleiding meer informatie openbaar te maken.

**NTS:2016418**

Zonder nadere concretisering wordt gesteld dat in de aanvraag volgens u te ruim is gelakt.

In heroverweging wordt in de documenten waar inhoudelijk op het project is ingegaan slechts persoonsnamen en tot personen herleidbare informatie (onder meer referenties) en samenwerkende partners geweigerd. Alle dierproef inhoudelijke informatie wordt, naar aanleiding van aanvullend contact met betrokken derde belanghebbende, openbaar gemaakt. In aanvulling van het bestreden besluit wordt opgemerkt dat:

In documenten 5 en 6 staat in de referenties de naam van een bij het project betrokken onderzoeker. Omdat deze gegevens rechtstreeks tot een bij het onderzoek betrokken persoon te herleiden zijn, wordt deze informatie niet

openbaar gemaakt. Wij vinden het belang van bescherming van deze gegevens groter dan het belang van openbaarmaking.

De naam van een instelling waarmee vergunninghouder samenwerkt is in document 4 op bladzijde 7, document 5 op bladzijde 5 en document 6 op bladzijden 3 en 4 (tweede weigering van de bladzijde) geweigerd. Aanvullend aan het bestreden besluit wordt gesteld dat de Afdeling eveneens geen aanleiding heeft gezien namen openbaar te maken waarmee een vergunninghouder in een bepaald project samenwerkt. Verwezen wordt naar de uitspraak van de Afdeling met kenmerk ECLI:NL:RVS:2017:952. De weigering is gebaseerd op het voorkomen van onevenredige benadeling.

### **Verzoek proceskostenvergoeding**

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht heeft u recht op een vergoeding van € 990,- zijnde 1 punt á € 495,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 495,- voor de gehouden hoorzitting.

### **Wijze van openbaarmaking**

Aangezien naar verwachting belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan twee weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

### **Beroep**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijst ik u naar [www.rechtspraak.nl](http://www.rechtspraak.nl).

U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor moet u wel beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor precieze voorwaarden.

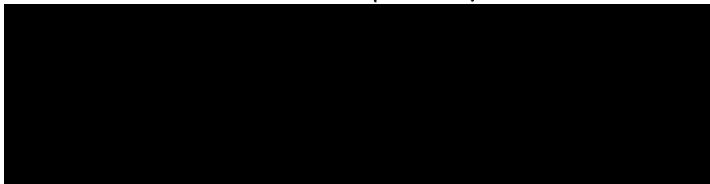


**Tot slot**

In deze brief heb ik u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,



Prof. dr. L. Hellebrekers  
Voorzitter





Inventaris Wob-verzoek W16-10S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015282</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x			x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x			x	
9	Appendix				x			x	
10	DEC-advies				x		x	x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
12	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
13	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
14	Mail reactie DEC 10-11-2015				x		x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	



22 OKT. 2015

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 / 282  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4

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

Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus	12007
Postcode en plaats	3501AA Utrecht
IBAN	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 9 . 2 0 1 5 |
| Einddatum  | 3 0 . 0 8 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Medicijnen voor plaatselijke behandeling van rugpijn en artrose
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Project Proposal [REDACTED] JU\_2015\_(LSH ArIADNE\_TargetCare)\_Appendix\_adjusted

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Utrecht

Datum 15-10-2015

Handtekening [REDACTED]



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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

The project focuses on developing treatment strategies for osteoarthritis (OA), neck and back pain of canine and human patients in close collaboration with academia from the medical and bioengineering field. Neck and back pain are strongly related to degeneration of the intervertebral disc (IVD), the structure present between the vertebral bodies of our spinal column. It consists of a gel like core, the nucleus pulposus (NP) consisting mainly of proteoglycans attracting water and some collagen II, and is surrounded by a more fibrocartilage-like structure called the annulus fibrosus. During degeneration the NP loses its proteoglycans, its water binding capacity and thereby its function as shock absorbing and movement enabling structure. In osteoarthritis, the articular cartilage, also consisting of a proteoglycan- and collagen-rich matrix, the proteoglycans are lost, hence reducing shock absorption and frictionless movement of the joint.

Current treatment of these diseases is mostly palliative and consists generally of pain relief by oral administration of analgesics and anti-inflammatory drugs, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Patients with late stage disease and refractory to pain medication can only be surgically treated. This is primarily done both in dogs and humans by arthroplasty in both OA and IVD disease. Arthroplasty is a successful treatment of OA, but requires revision of the device after around 15 years, which precludes its application in patients < 60 years. In IVD degeneration, arthroplasty is less successful and more dangerous due to the vicinity of the spinal cord. More often, the IVD is removed and the two adjacent vertebrae fused using autologous bone. All of these surgical treatments, independent of the disease, demand long term recovery, yield at best a suboptimal clinical outcome, and do not support a biological and hence functional repair of the diseased joint. For this reason, treatment strategies are being developed that either address the disease at earlier stages in order to prevent the need for heavy demanding surgery or are more effective at treating pain while using minimally invasive procedures.

Although the pathogenetic mechanisms are not yet fully elucidated, both OA and IVD degeneration share a clear association with inflammation, leading to loss of functional tissue components, through the induction of matrix degrading enzymes, and pain. The treatment strategies of OA and IVD concentrate on addressing the pain and inflammation with the aid of NSAIDs as well on improving the cartilage matrix quality by inducing an anabolic response with the aid of anabolic and/or anti-catabolic factors.

Although the widespread use of NSAID's such as [REDACTED] and corticosteroids in degenerative disease of joint cartilage and the IVD is justifiable, their application is accompanied by several drawbacks. First of all, the route of administration is usually systemic, which entails several side effects, in particular osteoporosis and reduced fracture healing (Seibel et al., 2013). Therefore, local administration is a logical approach. However, although in particular intra-articular administration of corticosteroids has shown to be efficacious, their effects are still limited to one month after injection due to rapid loss from the joint space, whereas multiple injections increase the risk of infection (Bellamy et al., 2009)(Trampuz and Widmer, 2006). Also the local delivery of growth factors and peptides has been shown in in vivo models to enhance tissue regeneration, with even phase I clinical trials on the delivery of BMP-7 into the OA joint. We are already studying compounds previously identified to possess regenerative properties (Gawri et al., 2013). However, also for the application of regenerative factors multiple injections have been shown to be required (Johnson et al., 2012). A solution to this problem is provided by the use of biomaterial-based controlled release systems.

**Biomaterials as sustained delivery agents in cartilage regeneration.** In addition to their role in supporting native or exogenously added cells, scaffolds, either solid or hydrogel-based, can be used for the delivery of cues required for regeneration. These cues may include regenerative factors such as growth factors or hormones, but also anti-oxidant and anti-inflammatory factors. Recent work by collaborators highlights the progress achieved in the field of joint cartilage repair with the aid of controlled delivery of biologics (Lam et al., 2015). Several biomaterials have been identified as potential vehicles in IVD degeneration as recently reviewed by Blanquer (Blanquer et al., 2012). Thus far only a limited number of publications on solid or hydrogel based-systems specifically developed for intra-discal controlled release is present. Nano- and microstructured injectable biomaterials have been used more often to achieve sustained release of regenerative factors, although they do not have a biomechanical nor intrinsic regenerative role in this type of application. Several bioactive substances have been incorporated into delivery systems for IVD regeneration employing primarily injectable natural hydrogels and solid synthetic microspheres. The loaded substances target different processes involved in cartilage degeneration, including mechanisms of cell senescence, matrix anabolism or catabolism, and inflammation. In this respect, [REDACTED] a systemic review on Biomaterials for intervertebral disc regeneration regarding their past performance and possible future strategies. This work has been resubmitted after minor revision and is under consideration at the journal *European Cells & Materials* (this manuscript is enclosed for your information. Based on this work it appears that the concept of employing biomaterials for the sustained delivery of agents in IVD regeneration is just emerging. However, the concept of local prolonged exposure to factors modulating regeneration and degeneration holds great promise by reduction of systemic side effects and increasing effectivity.

The project encompasses strategies for the treatment of OA and IVD degeneration that are at different levels in the chain of translation: those that are based on readily available FDA-approved compounds and are further developed in a preclinical setting before their translation in to "first-in-man" studies, and those that explore identified targets that have been shown at least in vitro and in vivo in small animal models to have a positive biologic effect. These strategies are fed with new compounds identified with the aid of fundamental research.

Note: the reference list has been included in the Appendix of the proposal

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

The overall aim is develop and validate injectable biomaterial-active compound combinations that effectuate controlled release of anti-inflammatory drugs and/or bioactive substances that induce an anabolic response for the treatment of IVD disease and OA. The deliverables of this project are

**2.1 Proof of concept of the applicability of slow release of small molecule anti-inflammatory drugs and regenerative factors for the long term inhibition of inflammation, tissue degeneration and pain.**

**2.2 Insight into the local side effects of high local and prolonged doses of AIAs and regenerative factors.**

**2.3 Detailed knowledge on the in vivo release kinetics of AIA and regenerative factors in relation to the implantation site and biomaterial degradation.**

*Why are deliverables 2.1-3 achievable:* The researchers in this project have gained experience in previous projects on the development and formulation of biomaterials for delivery of anti-inflammatory and regenerative therapeutics in OA and IVD degeneration. Also the previously identified regenerative factors are currently being incorporated in suitable biomaterial platforms by our industrial partners, experts in their field. In vivo, in particular promising preliminary results were obtained using an [REDACTED] based biomaterial platform (a refers to a biomaterial of a defined and fixed chemical composition that can be formed into different structures, including microspheres and hydrogels) for the generation of biomaterials in combination with anti-inflammatory drugs. The



biomaterial used is already used in several clinical trials for non-related diseases.

From a technological perspective, the research group has gained experience with several biomaterial platforms that effectuate sustained release of the loaded substance, including small molecules and peptides. These studies have been performed in the small and large animal models as implemented in the current project. Furthermore, we have active collaborations with companies developing these platforms within the context of other ongoing projects.

#### **2.4 Understanding of the role of inflammation in regeneration and demonstration of selected candidates as possible new regenerative and anti-inflammatory compounds for controlled local delivery.**

*Why is this achievable:* it is well known that every regenerative response is preceded by an inflammatory process. We have already identified some novel compounds that have been shown to possess regenerative and/or anti-inflammatory capacities in vitro. These will also be incorporated in suitable biomaterial platforms recently developed by our industrial partners, experts in their field. We have already achieved to bring to the veterinary clinic FDA approved anti-inflammatory compounds in several local controlled release biomaterials (intra-discal delivery).

### **3.3 Belang**

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

Although seldom a cause of morbidity, diseases of the musculoskeletal system impose a substantial burden on Western societies that is in addition increasing with ageing of the population. Amongst the diseases with most impact are osteoarthritis (OA) and chronic low back pain. Low back pain has been identified as one out of seven high burden conditions by the 2013 Report Priority Medicines for Europe and the World, which identifies key areas of priority research for pharmaceutical innovation to meet public health needs. The prevalence of osteoarthritis was predicted to grow from 81.4 million in 2009 to nearly 95 million by 2020 across the seven major markets. Approximately 20% of the canine population will develop secondary OA due to developmental joint diseases. In a special barometer report exploring health in EU citizens, the most common type of pain restricting daily activity was low back pain ([http://www.who.int/medicines/areas/priority\\_medicines/MasterDocJune28\\_FINAL\\_Web.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/MasterDocJune28_FINAL_Web.pdf)). It is one of the ailments associated with the largest loss of years lived without disability (Murray et al., 2012). In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs. Patients with late stage OA or disc disease and pain refractory to medication can only be surgically treated. Between 150 and 200 thousand spinal surgeries are performed annually in the EU. Surgical procedures such as disc excision and vertebral fusion lead to pain relief in the short-term, but they alter spine biomechanics, leading to further degeneration of surrounding tissue and adjacent discs (Higashino et al., 2010)(Jacobs et al., 2013). Failure rate for lumbar fusions is 20% to 40% after five years. Surgical procedures that maintain spine biomechanics, i.e. arthroplasty, have limited longevity and sufficient long-term follow up to determine effects on adjacent structures, e.g. facet joints, is lacking (Thavaneswaran and Vandeppeer, 2014). Furthermore, arthroplasty revisions are challenging and associated with high morbidity and costs (Hamilton et al., 2015).

#### **Scientific relevance**

The current project aims at treating osteoarthritis and chronic low back pain associated with intervertebral disc disease, by inhibition of tissue degeneration and enhancing intrinsic regeneration in human and canine patients. In addition, the incorporation of drugs into controlled release carriers for local application will provide for new formulations and treatments that circumvent systemic side effects. Even more so, it will deliver insight into the [REDACTED] and [REDACTED] release profile and degradation rate of the biomaterial platform. This basic knowledge can be further implemented in a faster translation from in vitro release profiles into the in vivo situation, taking into account the tissue specific properties that effect the behaviour of the biomaterial. Hereby, biomaterial platforms can be further fine-tuned in order to achieve optimal clinical results both in OA and IVD degeneration.

Based on the basic research part, the proposed project will also identify (new) mediators that are crucial in tissue matrix production and inflammation control and hence can be implemented to both degenerative joint and disc disease. Furthermore, it will give insight into the interplay of inflammation and regeneration, into the additive regenerative effect an advanced treatment strategy may engage, where these (new) mediators or chemotactic factors are used to attract endogenous MSCs.



### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

The project encompasses strategies for the treatment of OA and IVD degeneration that are at different levels in the chain of translation:

- (a) those that are based on readily available FDA-approved compounds and are further investigated and validated in preclinical studies for dose finding in small and safety and efficacy in large animals, in order to accelerate their translation in to "first-in-man/dog" studies, and
- (b) those that explore targets shown in vitro and in vivo to have a positive biologic effect. Safety and dose finding is then done in rat models. The next step of translation is undertaken in large animal models (goat for OA and dog for IVD).
- (c) those that are based on new compounds identified in fundamental research. Herein, we identify potential targets based on animal-free in vitro experiments. The promising bioactive substances are then further developed, incorporated in suitable controlled release biomaterial platforms. These will mainly be applied as [REDACTED], as these provide a more well controllable degradation (gels will easily fragment in a joint, which will hugely change their degradation and hence release behaviour) and as proteins are more protected from hydrolysis. Proof of principle studies will be done in small animals, followed by dose and safety studies, after which also large animal studies will be prepared for human and canine translation

The first bioactive substances to be studied will be the FDA-approved [REDACTED] inhibitor [REDACTED] and the corticosteroid [REDACTED]. These substances are currently being used in the treatment of OA and chronic low back pain. They will be incorporated in microspheres and evaluated for their effect on inflammation, joint tissue integrity and pain in OA and IVD disease, in comparison to respective bolus injections. In addition to evaluating the effect on general joint integrity, special emphasis will be on the effects on subchondral bone by using  $\mu$ CT analysis. In terms of regenerative factors, Link N peptide is identified as a promising candidate for local delivery of regenerative factors (Gawri et al., 2013). In addition, BMP and stem cell chemo-attractants have shown been shown to be potent inducers of a regenerative response (Imai et al., 2007)(Pereira et al., 2014). Fundamental research has just recently started and hence has not yielded any possible targets.

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

##### Objective 1 - Dose finding and insight into local side effects

The effects of bioactive substances administered in controlled release biomaterials will be evaluated in in vivo in the rat OA model and the canine model of IVD degeneration.

- a. **Rat OA model:** OA is induced in rats after transection of the anterior cruciate ligament and partial meniscectomy. Over the course of 4 weeks mild OA develops. This model is employed for both FDA-approved and the newly identified bioactive substances loaded on a biomaterial platform. The rat model is well established by one of our collaborators (dept Orthopedics, UMC Maastricht). Understanding of release kinetics and degradation of biomaterials by in vivo imaging is only technically feasible in a small animal model. Moreover, dosing studies can be done, which is not realistic in large animals. The rodent experiments will provide insight in possible side effects and effective doses, which can be used to make a rough estimate for the safe and effective dose in the large animals.
- b. **Rat model of induced IVD degeneration:** IVD degeneration is induced in the caudal discs of rats via needle puncture. Over the course of 4 weeks moderate IVD degeneration develops. This model is employed for dose finding of the newly identified bioactive substances that have been shown to have a positive biologic effect in *in vitro* studies. As such, the identified regenerative bioactive substances thus far include peptides and growth factors that are synthesized and hence expensive in their purchase. As such, dosing studies in large animal models are not realistic and the first steps are undertaken in this rodent model. The rodent experiments will provide insight in possible side effects and effective doses, which can be used to further test a smaller range of doses in spontaneous IVD degeneration in the experimental canine model, where several doses can be tested in one animal, to finally come to an estimate for the safe and effective dose in canine patients.

##### Objective 2 - Proof of concept in large animal models

The optimal doses found in objective 1 will be used in large animal models of OA and IVD degeneration to show proof of principle for long term inhibition of inflammation, pain and joint degeneration. Subsequently trials with canine and human patients can be initiated.

a. **Goat [REDACTED] model:** Optimal dosages in the rat model will be translated towards the goat [REDACTED] model of OA, to determine safety and efficacy before canine and human patients can be treated. The goat [REDACTED] model consists of [REDACTED], due to which a mild osteoarthritis develops over a period of 20 weeks. This model for OA closely resembles human and canine OA, as it does not involve ligament transection or injection of enzymes as done in small animal models, but is based on mechanical damage to the cartilage. The gross anatomy of the goat knee is fairly similar to both canines and humans, and in both canine and human patients the knee is the most frequently affected joint. Additional readout parameters to those used in small animal models will be cartilage tissue degeneration and synovial inflammation, in addition to biochemistry of ECM proteins and cytokines in synovial fluid.

Met opmaak: Engels (V.S.)

b. **Canine model of IVD degeneration:** Experimental Beagle dogs are employed on the basis that they consistently develop spontaneous IVD degeneration after ~1 year of age with similar clinical, radiographic, histological, and biochemical changes to humans. Hence studies with the FDA-approved bioactive substances in experimental dogs can be directly translated to canine and human patients with IVD degeneration.

As soon as safety and efficacy has been determined in the large animal models of OA and IVD a first translational step will be undertaken in canine patients treated treated at the Academic Veterinary Hospital of The Netherlands. Such studies will be performed within the 5-year period of the project. As a spin-off this project, a phase I clinical trial in humans will be feasible as soon as regulatory affairs and transfer of the newly developed treatment into a GMP-environment have been addressed.

**Canine patients with OA** Patients will be randomised to injection with loaded biomaterials or bolus. Readout parameters will be pain and quality of life (owner questionnaires), force plate analysis (on objective measurement of gait and lameness) and quantitative MRI imaging.

**Canine patients with IVD disease** will be randomised to injection with loaded biomaterials or bolus injections and followed up for a minimum of 6 months. Readout parameters will be pain as assessed by owner questionnaires, force plate analysis and MRI imaging, as here animals cannot be sacrificed to evaluate regeneration and inhibition of inflammation in a more detailed and exact manner. Force plate analysis gives a direct unbiased quantification of pain due to disease. Owners and examining veterinarian will be blinded to the treatment.

### Objective 3 - [REDACTED] of release kinetics of biomaterials and association with biological in vitro systems

Rationale: Biomaterial platforms are chosen on the basis of the properties of the targets that will be released in a sustained way. However, their release is dependent on biomaterial degradation, which in itself will depend on the local environment where the biomaterial is implanted. Blood and tissue fluid flow will have a large impact, but also the presence of an inflammatory response, as this is commonly accompanied by enzyme activity. The **rat OA and IVD degeneration model** will be employed to determine the effect of the local environment on degradation and release *in vivo*. For this purpose, labelled and bioactive substance-loaded biomaterials will be injected [REDACTED]

[REDACTED] Loss of label intensity and release of the bioactive substances in the blood will be monitored longitudinally. These techniques will provide insight into the speed of degradation and release profiles and be also useful for new projects on local delivery systems. Insight into the effects of release kinetics on cell and tissue phenotype will be gained in cultures of cartilage and disc cells and tissues explants and in cartilage tissue co-cultured with synovial tissue.

### Objective 4 - Control of inflammation in order to augment regeneration of cartilaginous tissues (OA&IVD degeneration); evaluate possible new regenerative and anti-inflammatory targets

Given the role of inflammation in regeneration, the interplay between inflammatory factors (including [REDACTED] and their metabolites) and growth factors/ chemo attractants will be studied in vitro extensively. In addition to further studying targets from literature, e.g. kartogenin, link-N, and caveolin-1 shown to be regenerative and play a role in inflammation (Gawri et al., 2013; Johnson et al., 2012) (Pavlidis et al., 2014) new emerging targets will also be

evaluated *in vitro*. If these factors indeed show to have positive effects on regeneration in the *in vitro* (co-)culture models and show appropriate release kinetics with retention of activity *in vitro*, they will also be incorporated in the controlled release biomaterial platforms to test the regenerative and anti-degenerative potency of these new release systems in the **rat OA and IVD degeneration models** and subsequently in the **large animal models**.

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

This project pursues biological repair of the diseased joint and IVD by combing both translational and basic research. The coherence between the different components and the different steps of the projects is illustrated in the figure included in the Appendix of the proposal.

By controlling inflammation we aim at reversing degeneration and augmenting regeneration of the degenerated cartilaginous tissue. In order to assist fast translation to the clinical situation (human and veterinary patients), the optimal dose of FDA-approved controlled release bioactive substances, for example [REDACTED] and [REDACTED] that efficiently control inflammation and degeneration without local side effects is identified in the rat OA model and the canine model of IVD degeneration. The efficacy of the treatment is further explored in a large animal model of OA (goat; [REDACTED] model). In order to be able to extrapolate these results to canine and human patients with OA/IVD degeneration and improve the strategy treatment the release kinetics of the bioactive substances is further studied dependent on the location of application and the tissue state (healthy/degenerated). As soon as safety and efficacy has been determined in the large animal models of OA and IVD, and release kinetics are comprehended, a first translational step will be undertaken in canine patients with OA or IVD disease within the 5-year period of the project. Likewise, a phase I clinical trial in humans will be feasible shortly after completion of the project, as soon as regulatory affairs and transfer of the newly developed treatment into a GMP-environment have been adressed. Furthermore, we study in depth the interplay of inflammation and chondrogenic signalling pathways in order to understand the mechanisms that drive regeneration of the cartilaginous tissue. Based on this fundamental work, newly identified anti-inflammatory and regenerative targets are studied in terms of their biologic effect on degenerated cartilaginous tissues. If these newly identified targets appear to be effective, follow up *in vivo* studies will employ rat models of OA and IVD degeneration for dose in finding.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Rat model for mild osteoarthritis
2	Rat model of induced IVD degeneration
3	██████ model for the induction of mild osteoarthritis (goat)
4	Canine model of IVD degeneration
5	Degradation of biomaterial and release kinetics
6	
7	
8	
9	
10	





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number                  | Type of animal procedure                                       |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Rat model for mild osteoarthritis"/> |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

The animal models is employed in order to address questions raised under key objective 1 (Dose finding and insight into local side effects ). To induce osteoarthritis in rat knees, the anterior cruciate ligament will be transected and a partial meniscectomy will be carried out. This model has been used in many publications before to induce OA and to study the effect of anti-inflammatory and regenerative treatments. Unilateral OA is induced and common groups

included in such an experiment are: placebo injected with the unloaded biomaterial (sham) and treatment groups injected with biomaterials loaded with different dosages of the bioactive substance. The major readout parameter is cartilage quality by histological scoring.

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

Prior to the experiment, the rats will undergo a clinical examination, including assessment of the stability of the knee joint. Severity procedure = minor

Also, pressure plate measurements will be performed to obtain starting values. Severity procedure = minor

Unilateral osteoarthritis is induced in rats under anaesthesia and proper peri-operative and post-operative analgesia by transection of the anterior cruciate ligament and partial medial meniscectomy. In total the surgical procedure will take about 30-45 minutes. Severity procedure = moderate

To assess the effect of bioactive compounds on osteoarthritic joints, 4-6 weeks after osteoarthritis is induced, these formulations will be injected directly into the knee joint. This injection will be performed on rats under anesthesia and proper pre-injection analgesia. Severity procedure = minor

The follow up period is 12-30 weeks post-injection, as this has been used in previous related experiments carried out in the scope of another project. A termination of the experiment, rats will be euthanized. Severity procedure = minor

per bioactive substance to be studied the following groups are studied:

- 1. unilateral OA, treated with placebo (biomaterial alone)
- 2. unilateral OA, treated with bioactive substance dose A + biomaterial
- 3. unilateral OA, treated with bioactive substance dose B + biomaterial
- 4. unilateral OA, treated with bioactive substance dose C + biomaterial

As soon as the safe dose and most efficacious dose has been established in a follow up study with a group of rats will be studied were unilateral OA is treated with a single injection of the bioactive compound with the same experimental set up and procedures. In this way we can minimize the animals employed, given that we with the current set up we will only study ONE dose of the bioactive substance with single injection and not all three dosages (A, B, and C)

Number of relevant comparisons = 6 / number of rats = 6 as explained in the statistical methods below

Where possible studies for bioactive substances loaded on the same biomaterial will be studied in parallel so that the control group is shared between the two studies, minimizing the number of animals by six.

Read out parameters:

In vivo:

- The rats will be assessed clinically: joint effusion will be measured, lameness will be scored and knee stability will be tested.
- Pressure plate measurements will be performed on a regular basis to assess the amount of functional disability caused by the osteoarthritis that has been induced and its possible relief by the bioactives.
- To measure systemic distribution and clearance of the injected actives, blood samples will be collected on predetermined timepoints.

Post mortem:

- microCT will be performed to assess radiologic changes in the knee joints at the end of the experiment. Knee joints that have received a specific treatment

will be compared to knee joints that have received a sham treatment.

- The knee joints will be collected for histopathological and biochemical analyses: histopathological assessment will be performed to study the severity of osteoarthritis present at the end point of the study. Also, additional analyses (stainings, immunohistochemistry) will be carried out, dependent on the research question. A part of the tissue can be collected for biochemical analyses: i.e. to measure if there is remaining biomaterial left.

---

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: the histological Mankin Osteoarthritis Score (as also used by others, for example Naveen et al 2013). Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.85% ( $\alpha=0.008$ ), and assuming standard deviations as observed in previous studies:

The Mankin OA score has a range from 0 to 14. We aim at an average Mankin score of 6 after OA induction, with a standard error of 1,5. We hypothesize that the injection of bioactive compounds as a treatment for OA will reduce the Mankin score with 30-40%. A total of six animals per experimental group has been calculated. Although we do not expect loss of animals during the experiment, we will included 1 extra animals per experimental group to prevent loss of power due to unforeseen circumstances. All in vivo studies are approached in this manner.

Reference:

Naveen SV, Ahmad RE, Hui WJ, Suhaeb AM, Murali MR, Shanmugam R, Kamarul T. Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis. *Int J Med Sci.* 2013 Dec 21;11(1):97-105.

---

## **B. The animals**

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

We prefer to use female rats since male rats can increase a lot in size and weight during the experiment. During this long term follow up, the female rat knees will fit in the microCT scanner, while this will not be the case for the male rats. We use rats from the age of 12-14 weeks, because then they are large enough for intra-articular injections and blood collection. Furthermore, skeletal growth does not influence IVD development any more at this age and both the OA and IVD model can be combined in one animal in this age range. Furthermore, female rats are preferred for this kind of experiment, since they are easy to keep and easy to handle. No effects on cartilage regeneration have been shown of fluctuating hormone levels, although in humans the frequency of OA in females is higher than males. However, as joint anatomy is also different in human females, it is not clear whether this is due to direct effects on cartilage metabolism or to the indirect effects of e.g. suboptimal alignment. Moreover, although ovariectomy was shown to have a clear effect on the development in various models of OA in female rodents, the administration of estrogens (=artificial fluctuation) to healthy reproductive female mice showed no clear effects, thereby suggesting that a total lack of estradiol rather than fluctuation affects disease progress (Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JPTM, van Osch GJVM. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment—a systematic approach. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2008;16(5):533–541) Thus far there have been no reports on gender differences in IVD degeneration.

Sprague-Dawley are purchased from the Charles River laboratories on the basis that previous experiments are on the same strain.

Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to use 63 rats for objective 1 (2 bioactive substances loaded on the same biomaterials, control group with boimaterial alone is shared between the two bioactive substances) and 69 rats for objective 4 (similar study design for 2 bioactive substances, + 6 animals extra in case the control group cannot be shared) in the period of 2015-2020. Altogether, 132 rats.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The joint is a complex organ, consisting of different tissue- and cell types. Moreover, the homeostasis of the tissue is being regulated by biomechanical forces, both internally and externally. In the case of OA, changes occur in multiple areas and also the biomechanical loading can change, all influencing the disease progress. Blood flow determines the speed at which injected drugs disappear from the joint after intra-articular injection. Up to now, it is not possible to mimic a whole joint in vitro, therefore animal experiments remain necessary in this phase of the development of drugs. However, a lot of tests regarding possible toxicity and release profiles have been performed in vitro, prior to the start of animal experiments.

Reduction: a power analysis has been performed to calculate the minimum amount of animals needed to see a significant effect. In order to further minimize the number of animals used, where application we address the questions of the project in joint in vivo experiment. A typical example is Objective 3, in which we study the [REDACTED] and [REDACTED] degradation of biomaterials. In a single in vivo study, we employ for the unloaded biomaterials the same rats to study in parallel the degradation rate after [REDACTED]. Only when the biomaterials are loaded with the bioactive substance rats are employed for the study of a single location, in this case the joint, and investigate the release profile in the blood circulation and the effects locally. The latter is done on the basis that controlled release of the bioactive substance into the circulation and hence may influence all parts of the body.

Refinement: In order to decrease the stress levels of the rats, they will be trained to get used to handling, blood collection and pressure plate measurements. Moreover, the rats receive proper analgesia after induction of OA, to inhibit acute pain.

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups. They will be trained prior to the experiment to get used to handling, fixation for blood collection (in a so-called blood collection 'sleeve') and pressure plate measurements. The first week after OA induction, the rats will be checked daily and if necessary, extra analgesia will be given.

Furthermore, animals are given cage enrichment and the animals are often examined and weighed by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment.



## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

complicated wound healing causing minor discomfort

Explain why these effects may emerge.

occasionally rats tend to chew on their sutures, in less than 10% of the animals

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

We use thin biodegradable sutures (size 4-0) that maintain their strength during the healing period of the skin; proper placement of the sutures prevents swelling of the skin and thereby prevents irritation to the animal. Surgery is performed by trained veterinarians for this procedure. In case of wound dehiscence, the skin is sutured again and animals do not chew on their sutures any more (based on past experience)

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

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

No > Continue with question K.

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

General clinical signs will be frequently observed. If clinical signs indicate severe discomfort (e.g. body weight loss 15% in 2 days) and animals cannot be treated adequately, animals are euthanized. Furthermore if an animal is unable to stand or walk in spite of treatment with proper analgesia for at least one day, the humane endpoint is reached.

Indicate the likely incidence.

We already have performed similar experiments in the past with n=21 rats and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. Incidence is expected to be < 5%.

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

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

moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

It is necessary to sacrifice the rats at the end of the experiment, to gain insight in the histopathological and biochemical processes in the joint. This can only be performed post mortem.

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

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

Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number                  | Type of animal procedure   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Rat model of induced IVD degeneration"/> |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

This animal model is employed in order to address questions within key objective no 1 (Dose finding and insight into local side effects of readily available bioactive substances) and key objective 4 (Evaluate possible new regenerative and anti-inflammatory targets). All strategies employed within this project rely on the employment of minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle, in which an imaging marker

or a bioactive substance, alone or loaded on a biomaterial that effectuates sustained release of the bioactive substance is injected once. The size of needle employed and the volume injected in each IVD will not induce IVD degeneration and hence will not disturb the balance of the IVD (Mao et al., 2011). Major readout parameters will be increase in disc height (measured on plain radiographs or on the basis of microCT scan) and the production of tissue extracellular matrix as determined by histology.

#### Reference

Mao HJ1, Chen QX, Han B, Li FC, Feng J, Shi ZL, Lin M, Wang J. The effect of injection volume on disc degeneration in a rat tail model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Jul 15;36(16):E1062-9.

---

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

Rats are allowed to acclimatize for at least 1 week and thereafter the experiments are initiated. IVD degeneration is induced in caudal IVDs (tail) of rats under general anesthesia and proper pre-operative analgesia. In total the procedure will take about 30-45 minutes. Degeneration of the caudal IVDs occurs after a single puncture. Procedure with minor severity.

Over the course of 4 weeks degeneration progresses and is confirmed by means of radiography 4 weeks after induction (Zhang et al. 2011). At T=0 (start of the treatment), treatment groups will be injected into the rat caudal IVDs on the side contralateral to the annular puncture. All injections will be done under anesthesia and fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection. Procedure with minor severity

At T=3 months after injection of the treatment groups, the in vivo experiment will be terminated and rats will be euthanized. Procedure with minor severity.

A typical example of experiment investigating (a) the additive effect of a controlled release system over a single injection of the bioactive substance alone and (b) the differential effect of loading dose of the bioactive substance is:

- 1. degenerated IVD, untreated
- 2. degenerated IVD, single injection of bioactive substance (dose 1)
- 3. degenerated IVD, biomaterial alone
- 4. degenerated IVD, biomaterial + bioactive substance (dose 1)
- 5. degenerated IVD, biomaterial + bioactive substance (dose 2)

relevant comparisons: 1 vs 2, 1 vs 4, 1 vs 5, 3 vs 4, 3 vs 5, 2 vs 4 ( a total of 6)

#### Read out parameters

##### In vivo:

- the release profile of the bioactive substance into the blood circulation is determined in plasma sampled at predetermined time points. Procedure with minor severity.
- Potential regenerative effects will be studied by obtaining conventional radiographic images at T=-4 weeks prior to induction of degeneration (under sedation), at T=0 (time of treatment, under sedation), at T=3 months (directly post-mortem radiographs and microCT images). The primary read out parameter is the percentage of change of the Disc Height Index (DHI) for each IVD measured on radiographs and on microCT scan images. Procedure with minor severity.

Post-mortem:

Radiography and micro-computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors. Thereafter, rat tails will be harvested and IVDs will be accordingly processed for biochemical analyses of the tissues and/or after macroscopic evaluation will be fixed, decalcified, and thereafter subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and immunohistochemical stainings).

Reference

Zhang H1, Yang S, Wang L, Park P, La Marca F, Hollister SJ, Lin CY. Time course investigation of intervertebral disc degeneration produced by needle-stab injury of the rat caudal spine: laboratory investigation. J Neurosurg Spine. 2011 Oct;15(4):404-13.

---

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: disc height index. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.008 ( $\alpha=0.05 / 6$ , in case of 5 treatment groups to be studied as described in the example above), and assuming standard deviations as observed in previous studies: in the rat degenerative disc model in which variation of 15% was observed after induction of IVD degeneration and a variation of 15-20% was observed after injection of a bioactive substance with a significant biologic effect, 5 IVDs should be sufficient in each group to observe significant differences. In order to minimize the number of animal employed per study and to minimize the "RAT" effect as random effect, we employ a block design of the study. Hence, based on power analysis 10 rats would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal fluoroscopy and post-mortem biochemical (n=5 rats), and histological analysis (n=5 rats). When biomolecular analysis is needed for functional analysis, additional rats (n=5) will be included in the study, given that biomolecular analysis will employ the whole IVD.

All in vivo studies are approached in this manner and dependent on the expected effect and the documented variation, we select the appropriate number of animals. When estimation of the size effect is not possible based on the available information, a pilot study with n=3 IVDs per treatment group in 3 rats will be conducted. Based on these findings, proper power analysis will determine the minimum number of IVDs/rats needed. In this project combinations of bioactive substances are not foreseen.

---

## **B. The animals**

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

The rat model of stab-induced IVD degeneration is a well described model that has been used previously for showing the effect of regenerative factors. Rats older than 3 months (age range 12-14 weeks) are being employed in the study so that they have reached skeletal maturity and the problems of IVD remodeling due to skeletal growth can be eliminated. Animals will be obtained from registered breeding companies such as Harlan or Charles river.

We prefer to use female rats for three reasons:

- (1) in order to reduce the number of animals employed we will, where possible, combine the current animal procedure with animal procedure no. 1 (rat OA model) where female mice are employed so that they fit into the micro-CT scanner for analysis knee-bone pathology.
- (2) male rats can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up.
- (3) in order to reduce variability and make comparisons between experiments possible we will need to concentrate on female rats within this project proposal.

Gender is expected not to influence the study. No effects have been described of progesterone on regeneration of tissue by NP cells and only two studies mention that estradiol can protect against induced cell death. As this is very limited and restricted to artificially induced cell death, and in human nor canine patients a connection between gender and disc degeneration was found, also at menopausal age, it is very unlikely that any effect of cycle will be evident.

Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to study two anti-inflammatory and four regenerative bioactive substances. Pilot studies will help determine power of the study or predefine the range of the dose of the bioactive substance to be studied (n=40). For each bioactive substance we expect to use 15 rats, i.e. a total of 90 rats for six bioactive substances. Altogether we expect to use 110 rats for this purpose in the period of 2015-2020, including n=20 for additional animals in case degeneration has not reached the expected level.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: These studies cannot be replaced with simple in vitro models or explant tissue cultures given that we need to translate the treatment strategies not only in a tissue-context but also a disease dependent-context where multiple signalling pathways are deranged. Within this project we employ the rat model of induced IVD degeneration as a preclinical/screening platform for new bioactive substances where dose finding and safety needs to be determined prior to taking the step towards a large animal model like the dog. The rat model is on the overall less severe as experimental animal procedure compared to the dog animal model described under Appendix no 4 (both moderate severity but in rats 5 levels and in dog 8 levels). In experimental rats the use of several levels of IVDs with a randomized block design strengthen the power of the studies (Reduction). Up to 5 caudal IVDs can be treated within in one experimental rat, indicating that up to 5 treatment groups can be included.

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one day post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, animals are given cage enrichment and the animals are often examined and weighed by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment. In order to decrease the stress levels of the rats, they will be trained to get used to handling and blood collection. Moreover, the rats receive proper analgesia after induction of IVD degeneration, to inhibit acute pain. If necessary, analgesia will be continued. Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, and imaging are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI). The body weight of the rats will be recorded weekly to obtain an impression of the overall health and wellbeing of the animal.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

Occasionally wound healing may be delayed or wounds may become superficially infected; in that case the rat may have to be housed solitary for a short period of time. There are no other specific signs to be expected except for general clinical signs related to the controlled release of the bioactive substances in the circulation that may affect organ function. Incidence is estimated to be less than 5%. As the IVDs in the tail are used, no neurological signs are expected other than possibly a bend in the tail, which however was not described in literature based on this model.



Explain why these effects may emerge.

Occasionally rats tend to chew on each other's wounds when housed in groups. Given that the induction of IVD degeneration is done in a minimally invasive way whereby the skin and IVD is punctured with a 21G needle, there may be a small puncture hole that will have to heal secondarily.

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

Frequent (at least daily) observation immediately after application of the injectable treatments will monitor general clinical signs of the animals. If clinical signs indicate severe discomfort and animals cannot be treated adequately, animals will be euthanized.

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

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

No > Continue with question K.

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

General clinical signs are observed frequently. If clinical signs indicate severe discomfort and animals cannot be treated adequately, animals are euthanized. One possible complication may be extensive infection of the tail.

Indicate the likely incidence.

literature does not report such complications and contact with researchers employing the model did not indicate that this is likely to happen.

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

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

moderate for all animals of the study given that in each animal 5 caudal IVD will be used to induce IVD degeneration - if single IVD degeneration is induced the procedure would be considered mild.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect post-mortem information that is very important in order to define the effect of the regenerative treatment, and understand the underlying mechanism of action

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3             | <input type="text" value="for the induction of mild osteoarthritis (goat)"/> |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

After determining the optimal dose in small animal model (OA induction in the rat, appendix no 4), the effect of the bioactive molecules in their biomaterial based controlled release systems will be studied in a goat model where OA is induced by scratching the cartilage of the femoral condyles. Mild OA and inflammation of the synovial lining will develop  as measured by histological scoring and biochemical analysis of extracellular matrix



degeneration will be the major readout parameter.

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter of each experiment. The primary read out parameter is histological score of the cartilage. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.125% (alpha=0.0125, when 4 relevant comparisons), and assuming standard deviations as observed in previous studies: 15%-30% was observed after injection of anti-inflammatory bioactive substance, four to six goats should be sufficient in each group to observe significant differences. All in vivo studies are approached in this manner and dependent on the expected effect and the documented variation, we select the appropriate number of animals.

## **B. The animals**

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

The [REDACTED] model for goats has been set up and validated (manuscript submitted) by the department of Rheumatology and department of Orthopaedics at the UMCU. The gross anatomy of the goat knee is fairly similar to both canines and humans, and in both canine and human patients the knee is the most frequently affected joint. Also in terms of function and biomechanics the goat knee joint resembles the human and canine knee joint more than rats. In horses, an accepted animal for research on regeneration of osteochondral defects, the metacarpophalangeal joint is studied, which is analogous to the human wrist with two layers of carpal bones. However, developing a [REDACTED] model of the metacarpophalangeal joint in horses would be hampered by the limited access to the dorsal aspect of the metacarpophalangeal joint and the narrowed space between phalanx 1 (P1) and the metacarpus (MC3) and in addition, this is not the joint most affected in either canine or human patients. Although the goat is ruminant and hence not ideal for studying enteral therapies, this project concentrates on local delivery of medication and hence this is not an issue. Goat models have been used as cartilage regeneration models before by the research group. Due to the size, the joint of goats is easily accessible for surgery and multiple read out parameters can be obtained from one animal. Female animals will be used as they are easier to handle and house together. Goats older than 1 year, and hence skeletally mature, will be purchased from a registered Dutch breeder in order not to have issues with skeletal remodelling seen during growth. There is only limited evidence regarding the role of gender hormones in OA in large animal models.

During this project we want to study two anti-inflammatory and two regenerative bioactive substances loaded on controlled release biomaterials and hence expect to employ max. 48 goats (4 studies).

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

- No, continue with question D.
- Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

- No
- Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

## **D. Replacement, reduction, refinement**

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

In vivo studies with goats are done after extensive in vitro laboratory investigation and dose-finding in small animals. Only the safe and promising bioactive substances loaded on controlled release biomaterials are investigated further. As such, a translational step in a large animal model cannot be replaced by in vitro testing, given that OA is a complex disease affecting the whole joint as an organ. Translational studies can only be done in vivo. In order to minimize animals, where the same biomaterial platform is employed for two studied bioactive substances, the placebo treated joints (i.e. with unloaded biomaterial) will serve as a control for both treatments. As such experiment for the two bioactive substances will be run in parallel in order to share the control between the two studies.

The UMCU has developed a preclinical platform employing the goat as an experimental animal for osteoarthritis. They will be involved in the in vivo studies that will be performed to ensure that all technical aspects are met and thereby to ensure reduction of the animals employed in the study. Further reduction of the animals employed in the study is achieved by the use of imaging techniques (1.5T Magnetic Resonance Imaging) that can follow cartilage quality in a longitudinal manner, and by refined post mortem analysis which achieves multiple read out parameters from each joint studied (for example, histology, biomolecular, and biochemical analysis)

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 2 weeks, they are housed in groups, freely walking in pens of approximately 20 square meters. There will be no dietary restrictions and the goats will have access to water ad libitum. They are only housed separately immediately after induction of the OA in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, animals are given toys as enrichment, including licking stones, car tires, and balls. Animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment. All injections will be done by a veterinarian diplomate of the European College of Veterinary Surgeons with expertise in orthopedics.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.



Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

#### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

In the goat, unilateral OA is induced and hence moderate unilateral lameness is expected to occur. Immediately after induction of OA, animals will receive pijnmedication over the course of the 1<sup>st</sup> week for pain relief. Other adverse effects that may occur is delayed or complicated wound healing.

Explain why these effects may emerge.

Lameness is related to the model, during the induction of OA goats are treated with oral pain medication (1<sup>st</sup> week after surgery). 6 weeks post-induction of OA, mild OA has developed and the animals are inherently mildly lame but do not receive pain medication, as the efficacy is studied of local delivery of anti-inflammatory and regenerative bioactive substances with an inhibitory effect on pain directly by inhibiting inflammation and/or indirectly by regenerating the tissue. Delayed wound healing occasionally occurs and is related to sutures that fail on the basis that the animals chew on them.

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

During induction of OA, regardless of the treatment, proper pain medication can be given to the animals to minimize pain. After induction of OA, when anti-inflammatory oral pain medication is not feasible due to the aim of the study, opioids will be employed.

#### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

- General clinical signs will be observed frequently. If the animals show severe discomfort and cannot be treated properly, they will be euthanized. Humane endpoints may include: jaw-grinding, 'staring' into space, reluctance to move, guarding of affected areas, limping or carrying a limb), vocalisations

Indicate the likely incidence.

The dept of Rheumatology, UMC Utrecht has performed similar experiments in the past with at least n=16 goats and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints

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

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

moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

In order to collect post-mortem information, including the major readout parameter histological scoring, important in order to define the effect of the regenerative treatment and also understand the underlying mechanism of action

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

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

Yes





## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Universiteit Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		4	Canine model of IVD degeneration

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

### 2 Description of animal procedures

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

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

Dependent on the question and the treatment strategy investigated we will study the effect of the regenerative and anti-inflammatory strategies in mild and severe IVD degeneration. Beagle dogs older than 1 year have in all IVDs mild degeneration (Bergknut et al. 2012). Severe degeneration of the IVD with evident loss of disc height is induced by puncture of the IVDs (Serigano et al. 2010). All strategies employed within this project rely on the employment of

minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle, in which the bioactive substance alone, or loaded in a biomaterial that effectuates sustained release of the bioactive substance is injected once. Major readout parameters include clinical symptoms, disc height loss and inflammation, which are only present in animals with severely degenerated IVDs, and restoration of IVD tissue, as determined by histology and biochemical analysis of the content of tissue extracellular matrix molecules. Regeneration can be observed both in mildly and severely degenerated discs.

---

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

At the initiation of the in vivo study, all experimental dogs will undergo general clinical and orthopedic examination and will be subjected to MRI to determine the grade of IVD degeneration by means of Pfirrmann scoring. MRI will be performed with a 1.5 Tesla scanner. Six weeks before the start of treatment (T=-6 weeks), 5 lumbar IVDs per dog will undergo nucleotomy as follows: under fluoroscopic guidance a needle will be inserted to center of the disc and the NP will be aspirated. Equal volumes of nucleus pulposus (NP) tissue will be removed from each IVD and confirmed by weighing the nucleotomized tissue on a micro-balance. To confirm that degenerated Pfirrmann grade 4-5 discs are indeed created by this procedure, an MRI will be performed at T=0 months, i.e. 6 weeks after induction of IVD degeneration.

At T=0 (start of the treatment), the bioactive substances either or not in controlled release biomaterials will be injected into the canine IVDs on the side contralateral to the annular puncture, if applicable. All injections will be done under fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection. At T=3 months, the in vivo experiment will be terminated and dogs will be euthanized

Read out parameters

In vivo:

Potential regenerative and anti-inflammatory effects will be studied by obtaining conventional T2-weighted images and quantitative T2 maps in a longitudinal manner. At all time points, i.e. at T=-6 weeks (baseline, at induction of severe disc degeneration), at T=0 (time of treatment), and at T=3 or 6 months, the following read out parameters will be determined:

- Pfirrmann grade of mid-sagittal slices of T2-weighted MR images (Bergknut et al. 2011).
- Disc height index (DHI) will be calculated on T2W images for each IVD (Willems et al. 2015).
- For analysis of quantitative MR images (for example T2 values), an oval shaped region of interest (ROI) will be manually segmented on mid-sagittal sections, to select NP tissue in each IVD using the free open-source DICOM viewer Osirix (Pixmeo, Geneva, Switzerland). Imaging values will be computed by calculating the mean signal intensity in each ROI (Willems et al. 2015).

Post-mortem:

Radiography and computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors. Thereafter, tissues will be collected for histological, biomolecular, and biochemical analysis. Where indicated, after fixation tissue samples will be subjected to micro-CT evaluation.

---

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter of each experiment. Where regeneration is the focus, the primary read out parameter is disc height index and glycosaminoglycan content by biochemistry, while where inflammation is the focus, the primary read out parameter are (anti)inflammatory cytokines extracted from the treated IVDs. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.8% (alpha=0.008, when 6 relevant comparison), and assuming standard deviations as observed in previous studies: 15%-30% was observed after injection of anti-inflammatory

bioactive substance, four to seven discs should be sufficient in each group to observe significant differences. In order to minimize the number of animal employed per study and to minimize the dog effect as random effect, we will inject several IVDs per animal, employing a block design of the study. Up to eight different treatment groups can be studied in each dog, including the untreated and placebo treated IVDs.

As an example in the study where the effect of a bioactive substance incorporated in a controlled biomaterial platform is studied in comparison to a single injection of the bioactive substance alone the following groups will be studied

- 1. untreated mild IVD degeneration
- 2. untreated severe IVD degeneration (induced by puncture as described in the experimental approach)
- 3. biomaterial alone in mild IVD degeneration
- 4. biomaterial alone in severe IVD degeneration
- 5. bioactive substance in mild IVD degeneration
- 6. bioactive substance in severe degeneration
- 7. biomaterial + bioactive substance in mild IVD degeneration
- 8. biomaterial + bioactive substance in severe IVD

Relevant comparisons- for mild IVD degeneration: 1 vs 3, 1 vs 5, 1 vs 7, 3 vs 7, and 5 vs 7

Relevant comparisons- for severe IVD degeneration: 2 vs 1, 2 vs 4, 2 vs 6, 2 vs 8, 4 vs 8, and 6 vs 8

All these treatment are applied in a block design based on a latin square in each animal, and hence each treatment is present as n=1 per experimental animal. Hence, max 7 beagles would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal quantitative MR imaging and post-mortem biomolecular, biochemical, and histological analysis. All in vivo studies are approached in this manner and depend on the expected effect and the documented variation, we select the appropriate number of animals.

#### References:

- \* Bergknut N, Rutges JP, Kranenburg HJ, Smolders LA, Hagman R, Smidt HJ, Lagerstedt AS, Penning LC, Voorhout G, Hazewinkel HA, Grinwis GC, Creemers LB, Meij BP, Dhert WJ. The dog as an animal model for intervertebral disc degeneration? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Mar 1;37(5):351-8
- \* Bergknut N, Auriemma E, Wijsman S, Voorhout G, Hagman R, Lagerstedt AS, Hazewinkel HA, Meij BP. Evaluation of intervertebral disk degeneration in chondrodystrophic and nonchondrodystrophic dogs by use of Pfirrmann grading of images obtained with low-field magnetic resonance imaging. *Am J Vet Res*. 2011 Jul;72(7):893-8.
- \* Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res*. 2010 Oct;28(10):1267-75.
- \* Willems N, Bach FC, Plomp SG, van Rijen MH, Wolfswinkel J, Grinwis GC, Bos C, Strijkers GJ, Dhert WJ, Meij BP, Creemers LB, Tryfonidou MA. Intradiscal application of rhBMP-7 does not induce regeneration in a canine model of spontaneous intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2015 May 27;17:137.

---

## **B. The animals**

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

The canine species is considered to be a suitable model to study the process of IVD degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar clinical, macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans. The Utrecht referral animal university clinic frequently encounters canine patients with back pain and neurologic deficits due to IVD disease. Hence the dog serves as a preclinical model for translation towards the "first in man" studies, while it serves also the veterinary patient.

Each in vivo study is performed on the lumbar IVDs of adult Beagle dogs older than 1 year in order to have early degenerated IVDs and not older than 3 years. This range of age results into a cohort of animals with degenerated IVDs with a Pfirrmann score of 2-3. Animals are ordered at Harlan or Marshal laboratories dependent on the availability and the age.

Regarding the sex of animals: In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients (Smolders et al 2013), hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predeliction also for the human population of patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011).

In short term studies (range of 3 months) we aim at having a sex ratio of 1:1 in the study cohort in order to have both sexes represented in the study. In long term studies of > 6 months, we preferably work with male dogs in order not to have issues with the cyclus of female dogs. Female dogs have twice a year an oestrus cycle and when not used for breeding castration is advised in order to diminish the risk for development of breast cancer and other complications of irregularities of the cycle, including pseudopregnancy and pyometras, and accidental fertilisation can not be excluded during long term housing of the animals. For this reason, female dogs when not used for breeding should be sterilised, which would add another experimental procedure with moderate severity.

Over the course of the project we estimate to employ max 28 dogs, as we aim to test at least two-anti-inflammatory drugs and two known regenerative factors with max n=7 per study (4 studies)

4 studies: The anti-inflammatory drugs have already been selected on the basis of preceeding experimental work: [REDACTED] and [REDACTED]. The regenerative drugs cannot be defined at this stage, given that preclinical work is being performed and will also be conducted within the course of this project before definite selection of new candidates. Over the course of this project we do not foresee combination of treatment. In follow up projects, based on the findings of this proposal, treatment strategies may contain combinatorial treatment of sequential treatment of anti-inflammatory and regenerative drugs.

References: Siemionow et al. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. Spine (Phila Pa 1976). 2011 Aug 1; 36(17): 1333-1339.

Smolders LA et al. Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: chondrodystrophic and non-chondrodystrophic breeds. Vet J. 2013 Mar;195(3):292-9.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

After extensive development of treatment strategies based on in vitro and in vivo experimental studies in small animal models, it is essential that translation occurs in an animal model that resembles the human situation. In the chain of translation the Beagle dog is indispensable. The UU has developed a preclinical platform employing the Beagle dog as an experimental animal and veterinary patients with lower back pain (Figure in Appendix). In experimental animals the use of several IVDs per animal in combination with a randomized block design strengthen the power of the studies (Reduction) and longitudinal follow up of the animals is done by modern imaging techniques (1.5T Magnetic Resonance Imaging and 64-slice Computer Tomography), while in canine patients an additional read out parameter is objective gait analysis (force plate). For the laboratory dogs, post mortem analysis is performed by histology, biomolecular, and biochemical analysis from each IVD (Refinement).

In order to further minimize the number of animals we will also evaluate whether use of the IVDs in the tail of the Beagles is also feasible. In this respect, we would be able to have more experimental conditions or duplicates per animal. The tail is being employed in the IVD field in rats and mice, where IVD degeneration is induced either by puncture of the tail or looping of the tail. In this respect, inducing disc degeneration by puncture in the tail of the dog would minimize discomfort, given that the IVD in the tail is easily approached by a minimal invasive technique assisted by fluoroscopy. Nevertheless, one of the limitations of the "canine tail model" would be that the size of the IVDs is much smaller than the lumbar IVDs, and thereby determining all biochemical, biomolecular and histological parameters in each IVD (as described under the 3R section for the lumbar IVDs) would not be feasible.

---

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

---

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one week post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, animals are given toys as enrichment and are allowed to be for at least one hour outside their wards in order to play. Furthermore, animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment.

Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, imaging and force plate analysis are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), neurology (ECVN), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI).

---

### **Repetition and duplication**

---

**E. Repetition**

---

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

---

### **Accommodation and care**

---

**F. Accommodation and care**

---

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

No

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

---

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### **Classification of discomfort/humane endpoints**

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

Occasionally wound healing may be delayed; in that case the dog may have to be housed solitary for a short period of time.

Explain why these effects may emerge.

Animals are given an Elisabethian collar after IVD degeneration is induced. This is a plastic collar attached around their neck and is extending further than their mouth. In this way one can prevent them from licking their wound, but certain dogs have proven to be very inventive and still manage to get to their wound.

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

proper suture techniques will be applied (subcutaneous sutures will prevent wound dehiscence)

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

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

No > Continue with question K.

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

We frequently observe general clinical signs, with higher frequency in the period pre- and post-induction of IVD degeneration and initiation of the treatment.



Clinical signs related to the animal model may include: paraparesis, paralysis, unilateral lameness of the hind limb, proprioceptive disorders, urinary incontinence. These neurologic signs are related to herniation of the IVD and can vary dependent on the location of the herniation. Humane endpoints include: acute paralysis. In case of the other neurologic signs, they are considered a humane endpoint when the neurologic status of the dog is not improving after initiation of proper treatment that primarily consists of anti-inflammatory medication and if needed decompressive surgery of the allocated IVDs. In the latter, the decompressed IVDs will be excluded from the study, while the other IVDs and the allocated treatment group can be followed up until termination of the experiment. If general clinical signs indicate severe discomfort and animals cannot be treated adequately, animals are euthanized.

Indicate the likely incidence.

We do not expect this to occur. We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. Incidence less than 2%.

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

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

moderate. The severity of the procedure would be mild if only one IVD would be employed per animal and becomes moderate in the described model where up to 8 IVDs can be implemented in the study. This project aims to perform 4 studies, per study 8 treatment. At an n=7 per treatment a total of 28 animals will be undergoing a procedure with moderate severity. If a single IVD would be studied per animal, that would result in the use of 224 dogs with a mild procedure. We believe that this reduction in number outweighs the increase in severity.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect post-mortem information that is very important in order to define the effect of the regenerative treatment and also understand the underlying mechanism of action

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

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

Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number                  | Type of animal procedure   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="5"/> | <input type="text" value="Degradation of biomaterial and release kinetics"/> |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

The degradation of the biomaterial used and release kinetics of the bioactive substances loaded (key objective 3) will be studied in experiments in which the effect of  and the presence of  process at that location are studied. To this end osteoarthritis and IVD degeneration are induced as described in appendices nr 2 and no 4, but also non diseased joints and IVDs will be included. Optimal doses of actives as identified in the procedures

described under objective 1 of this project will both be providing bolus controls for the latter experiments in terms of cartilage regeneration (histological scoring) and release profiles as also described in appendix no 2 (in order to reduce the number of animals employed). For IVD injection, the same animals can be used for biomaterial degradation studies by [REDACTED] or [REDACTED] labelling of biomaterials (readout parameter [REDACTED]), as the released actives will attain negligible concentrations inside the body after their release from the IVD. The [REDACTED] imaging methods will be validated in separate animals by tissue extraction, where biomaterial constituents measured by biochemical assays will be the major readout.

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

Pilot study: in order to validation of the imaging methods, biomaterials loaded with a range of known dosages of label will be injected into [REDACTED] and [REDACTED] of dead rats, n=3 per dose and per location. Surplus euthanized for other unrelated experiments will be employed for this purpose. After injection, the cadavers will be subjected to [REDACTED] and the signal will be correlated with the dose. Validation of each technique will not only determine the quantitative correlation between signal and dose, but will also give information on the threshold of the label that is still detectable by imaging. Thereafter, in vivo experiment with rats will be performed as described in study I.

Experimental groups Study I: to determine the effects of [REDACTED] and the presence of a [REDACTED] process on degradation rates of biomaterial-based carriers. Four biomaterial platforms can be studied in 12 rats. The platforms will be loaded with [REDACTED] or [REDACTED] label and injected separately in each location.

For the example presented for biomaterial 1 and biomaterial 2 below the major readout will be the NIR signal over time.

Experimental groups: based on locations, all locations are employed in each rat

- 1. [REDACTED]-loaded biomaterial 1
- 2. [REDACTED]-loaded biomaterial 1
- 3. [REDACTED]-loaded biomaterial 1 + [REDACTED]-loaded biomaterial 2 (each in one degenerated IVD per rat, n=1 per treatment).
- 4. [REDACTED]-loaded biomaterial 1 + [REDACTED]-loaded biomaterial 2 (each in one degenerated IVD per rat, n=1 per treatment).
- 5. [REDACTED]-loaded biomaterial 1 and 2 (separate locations)
- 6. [REDACTED]- loaded biomaterial 1 and 2 (separate locations)

NB: In order to reduce the number of animals for key objective 3, in these 6 rats additional degenerated IVDs per rat ( n=3 rat tails) will be injected with one biomaterial loaded with active 1 in degenerated IVDs (n=3 rats). The release profile of the bioactive substances is studied with blood collection at predetermined time points

Procedure severity = moderate on the basis that more locations are injected per rat.

Relevant comparisons for [REDACTED] degradation: 1 vs 3-biomaterial 1, 1 vs 5-biomaterial 1, 1 vs-6 biomaterial 1, 3-biomaterial 2 vs 5-biomaterial 2, and 3 vs 5-biomaterial 2.

Relevant comparison for [REDACTED] degradation: 1 vs 2, 3 vs 4 for biomaterial 1, and 3 vs 4 for biomaterial 2

Experimental groups study II:

Aim: to determine the [REDACTED] specificity of release of bioactive substances from loaded biomaterials. This is only done for a biomaterial of which it is known that it is sensitive to [REDACTED] processes.

Loading dose of the biomaterial: a single dose, highest dose without appreciable side effects from rat dose-study as described under objective 1 of this

project

Approach: OA is induced with anterior cruciate ligament transection and partial meniscectomy / IVD degeneration is induced by puncture as described in appendix description animal procedures no. 4 and 2, respectively. Procedure severity = moderate

Locations treated: knee, IVD; number of animals employed 22 ( total of 28, given that n=6 is studied in study I to reduce number of animals employed), for two bioactives , that amounts to 58.

The experimental groups are:

- 1. Rats with [REDACTED] induced –biomaterial plus bioactive substance [REDACTED] injected with unloaded biomaterial 1 (n=7)
- 2. Rats [REDACTED] induced biomaterial + bioactive substance in [REDACTED] injected with unloaded biomaterial (n=7)
- 3. Rats [REDACTED] biomaterial + bioactive substance (n=7 of which 3 from study I)
- 4. Rats with [REDACTED] biomaterial + bioactive substance (n=7 of which 3 from study I) (see appendix no 2)

Relevant comparisons: 1 vs 2, 3 vs 4, 1 vs 3, 2 vs 4 ([REDACTED]- and [REDACTED]-dependent comparisons)

One of the first studies to be performed with this experimental design will include two anti-inflammatory compounds, i.e. [REDACTED] and [REDACTED].

Read out parameters:

In vivo:

- The rats of the OA groups will be assessed clinically: joint effusion will be measured, lameness will be scored and knee stability will be tested. Severity procedure = minor
- Pressure plate measurements will be performed for the OA groups on a regular basis to assess the amount of functional disability caused by the osteoarthritis that has been induced. Severity procedure = minor
- To measure release kinetics of the loaded compounds, blood samples will be collected on predetermined timepoints. To limit the burden for the animals only in bolus conditions and rats with induced IVD degeneration the release profile in blood circulation will be determined for the first 3 weeks of the study. The remaining of the group will be subjected to less time points than 12 of blood collection. The time points will be determined based on the release profile documented during the dose response study done under objective 1 of the project. Severity procedure = minor
- At the end of the experiment animals are euthanized to collect tissues for further analysis. Severity procedure = minor

---

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

These types of studies are not subjected to power analysis given that the primary read out parameter is not efficacy of the treatment. The aim of these studies is to better understand release kinetics in order to further fine tune the development of the controlled release systems addressed in this project. For this purpose a minimum of n=5 per treatment was chosen in order to have sufficient animals for the possible biological variation.

## **B. The animals**

---

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

We prefer to use female rats since male rats can increase a lot in size and weight during the experiment. During this long term follow up, the female rat knees will fit in the microCT scanner, while this will not be the case for the male rats. We use rats from the age of 12-14 weeks, because then they are large

enough for intra-articular injections and blood collection. Furthermore, skeletal growth does not influence IVD development any more at this age and both the OA and IVD model can be combined in one animal in this age range. Furthermore, female rats are preferred for this kind of experiment, since they are easy to keep and easy to handle. No effects on cartilage regeneration have been shown of fluctuating hormone levels, although in humans the frequency of OA in females is higher than males. However, as joint anatomy is also different in human females, it is not clear whether this is due to direct effects on cartilage metabolism or to the indirect effects of e.g. suboptimal alignment. Moreover, although ovariectomy was shown to have a clear effect on the development in various models of OA in female rodents, the administration of estrogens (=artificial fluctuation) to healthy reproductive female mice showed no clear effects, thereby suggesting that a total lack of estradiol rather than fluctuation affects disease progress (Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JPTM, van Osch GJVM. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment—a systematic approach. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(5):533–541) Thus far there have been no reports on gender differences in IVD degeneration.

Sprague-Dawley are purchased from the Charles River laboratories on the basis that previous experiments are on the same strain.

We aim to study 2 anti-inflammatory bioactive substances (██████████ and ██████████). In total 4 biomaterials will be studied that will all be studied in terms of location-dependent degradation, but only two biomaterial-bioactive combinations will also be used to evaluate disease-dependent release. In the experimental study design as described above we employ 12 rats in Study I and 44 rats in Study II for 2 bioactive substances for the treatment of OA and IVD degeneration. We have also included 20 rats for pilot studies (if we do not manage to find cadavers for the pilot study described in this appendix) and max 10 rats for drop outs due to insufficient IVD degeneration induced. Altogether, we estimate to use 86 rats for this specific experimental procedure in the period of 2015-2020.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

- No, continue with question D.
- Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

- No
- Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The joint and IVD are complex organs, consisting of different tissue- and cell types. Moreover, the homeostasis of the tissues is being regulated by biomechanical forces, both internally and externally. In the case of OA and IVD degeneration, changes occur in multiple areas and also the biomechanical loading can change, all influencing the disease progress. Up to now, it is not possible to mimic a whole joint/IVD in vitro, therefore animal experiments remain necessary in this phase of the development of drugs. However, a lot of tests regarding possible toxicity and release profiles have been performed in vitro, prior to the start of animal experiments.

Reduction: In order to further minimize the number of animals used, where applicable we address the questions of the project in joined in vivo experiments. A typical example is Objective 3, in which we study the [redacted] and [redacted] degradation of biomaterials. In a single in vivo study, we employ for the unloaded biomaterials the same rats to study in parallel the degradation rate after [redacted] injection. Only when the biomaterials are loaded with the bioactive substance rats are employed for the study of a single location, in this case the joint, and investigate the release profile in the blood circulation and the effects locally. The latter is done on the basis that controlled release of the bioactive substance into the circulation and hence may influence all parts of the body.

Refinement: In order to decrease the stress levels of the rats, they will be trained to get used to handling, blood collection and pressure plate measurements. Moreover, the rats receive proper analgesia after OA and IVD induction injections, to inhibit acute pain. If necessary, analgesia will be continued.

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups. They will be trained prior to the experiment to get used to handling, fixation for blood collection (in a so-called blood collection 'sleeve') and pressure plate measurements.

Furthermore, animals are given cage enrichment and the animals are often examined and weighed by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

Induced IVD degeneration model: occasionally wound healing may be delayed or wounds may become superficially infected; in that case the rat may have to be housed solitary for a short period of time.

OA rat model: complicated wound healing causing minor discomfort

Explain why these effects may emerge.

Induced IVD degeneration model: Occasionally rats tend to chew on each other's wounds when housed in groups. Given that the induction of IVD degeneration is done in a minimally invasive way whereby the skin and IVD is punctured with a 21G needle, there may be a small puncture hole that will have to heal secondarily.

OA rat model: occasionally rats tend to chew on their sutures (<10% of the rats). If there is wound dehiscence, we suture the skin again and have experienced that the rats do not further chew on their sutures.

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

Induced IVD degeneration model: During the first pilot experiment, the effect of the IVD puncture will be assessed. Puncture with a needle is not expected to induce substantial skin wounds and hence individual housing of the treated animals for one day after the treatment will most probably not be necessary.

Rat OA model: we use thin biodegradable sutures (size 4-0) that maintain their strength during the healing period of the skin; proper placement of the sutures prevents swelling of the skin and thereby prevents irritation to the animal. Surgery is performed by trained veterinarians for this procedure.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

- General clinical signs will be frequently observed. If clinical signs indicate severe discomfort (e.g. body weight loss 15% in 2 days) and animals cannot be treated adequately, animals are euthanized. Furthermore if an animal is unable to stand or walk in spite of treatment with proper analgesia for at least one day, the humane endpoint is reached.

Indicate the likely incidence.

We already have performed similar experiments in the past with n=21 rats and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. Incidence is expected to be < 5%.

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

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

moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

It is necessary to euthanized the rats at the end of the experiment, to gain insight in the histopathological and biochemical processes in the joint and IVD. furthermore, in order to determine the biomaterial left non degraded in each location, the surrounding tissues need to be examined. The latter is of importance in order to determine at which interval human and veterinary patients can safely receive locally the loaded biomaterial. This can only be studied in post mortem collected tissues.

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

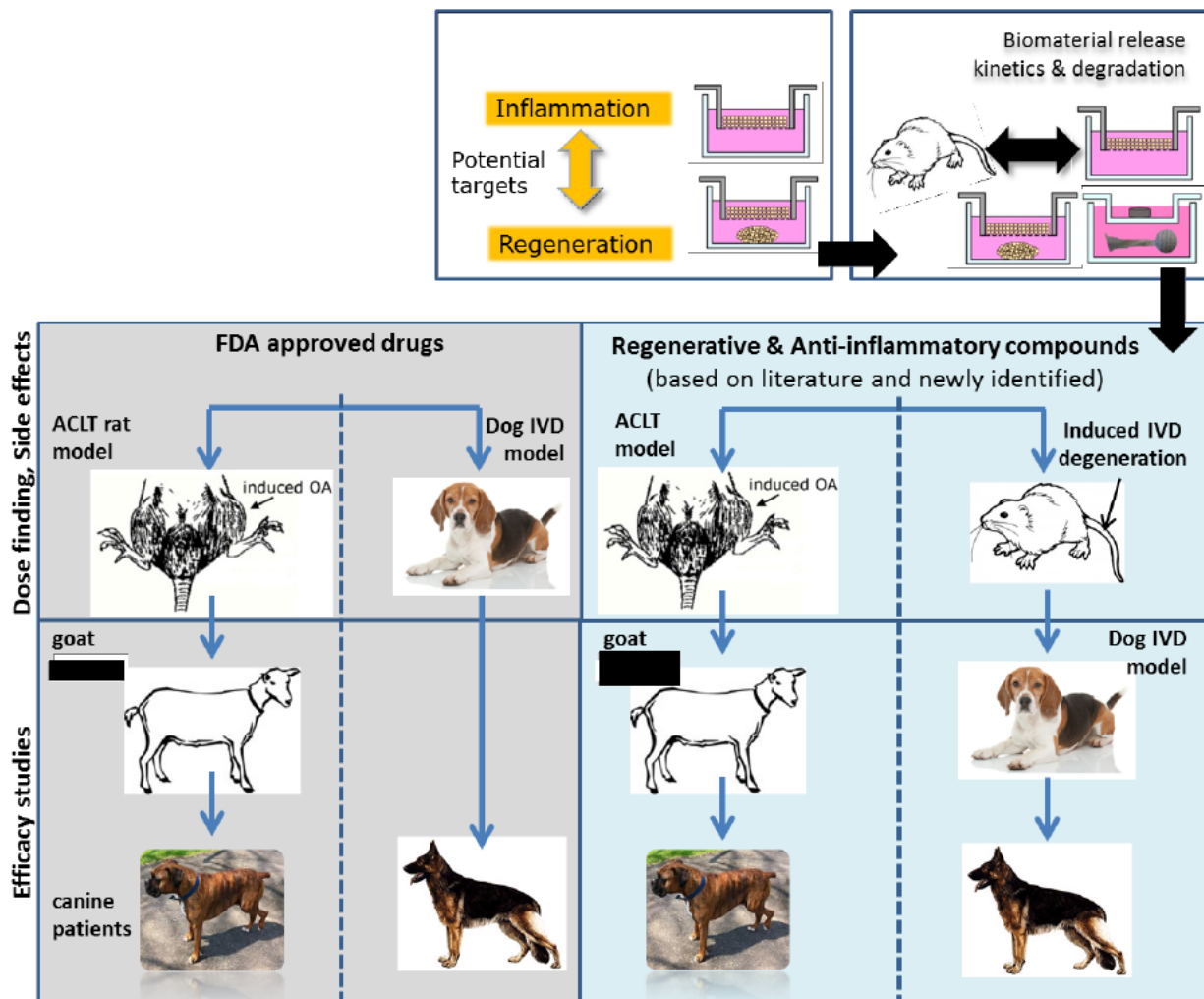


**Project: 2015.II.813.025**

**Title: Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases**

**Appendix: Coherence of the project**

This project pursues biological repair of the diseased joint and IVD by combining both translation and basic research. The coherence between the different components and the different steps of the projects is illustrated in the figure.



**Figure legend:** Animal studies largely consist of two distinct stages;

1) in small animals where proof of principle and therapeutic window (safety and optimal effectivity) will be determined and 2) large animals, where the effects in large and more clinically relevant models are being studied. As soon as safety and efficacy has been determined in the large animal models of OA and IVD, and release kinetics are comprehended, a first translational step will be undertaken in canine patients with OA or IVD disease within the 5-year period of the project. Likewise, a phase I clinical trial in humans will be feasible shortly after completion of the project, as soon as regulatory affairs and transfer of the newly developed treatment into a GMP-environment have been adressed

Therapeutic compounds that will be applied in animal study stages will have followed three different preceding trajectories;

1) FDA-approved drugs that have already been shown to be active in the clinic will directly enter the first stage, 2) compounds that have shown proof of principle in literature and 3) newly identified targets in the projects' fundamental research part, after validation in vitro of effectivity and optimal release profiles.

In addition, general information on the aspects of local controlled release will be answered by studying release by biomaterials loaded with labels at [redacted] ("Biomaterial release kinetics & degradation").

## References used in the project proposal

- Bellamy N, Campbell J, Welch V, TI G, Bourne R, Ga W (2009) Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *The Cochrane Library*. 2; 1-120
- Blanquer SB, Sharifi S, Grijpma DW (2012) Development of poly(trimethylene carbonate) network implants for annulus fibrosus tissue engineering. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**: 177–184.
- Gawri R, Antoniou J, Ouellet J, Awwad W, Steffen T, Roughley P, Haglund L, Mwale F, Hospital RV, Scoliosis M, Arabia S (2013) BEST PAPER NASS 2013 : LINK-N CAN STIMULATE PROTEOGLYCAN SYNTHESIS.
- Hamilton DF, Howie CR, Burnett R, Simpson a HRW, Patton JT (2015) Dealing with the predicted increase in demand for revision total knee arthroplasty: challenges, risks and opportunities. *Bone Joint J.* **97-B**: 723–728.
- Higashino K, Hamasaki T, Kim JH, Okada M, Yoon ST, Boden SD, Hutton WC (2010) Do the adjacent level intervertebral discs degenerate after a lumbar spinal fusion? An experimental study using a rabbit model. *Spine (Phila. Pa. 1976).* **35**: E1144–52.
- Imai Y, Okuma M, An HS, Nakagawa K, Yamada M, Muehleman C, Thonar E, Masuda K (2007) Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine (Phila. Pa. 1976).* **32**: 1197–205.
- Jacobs WCH, Rubinstein SM, Koes B, van Tulder MW, Peul WC (2013) Evidence for surgery in degenerative lumbar spine disorders. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **27**: 673–84.
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG (2012) A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science* **336**: 717–21.
- Lam J, Lu S, Kasper FK, Mikos AG (2015) Strategies for controlled delivery of biologics for cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **84**: 123–34.
- Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**: 2197–223.
- Pavlidis S, Gutierrez-Pajares JL, Katiyar S, Jasmin J-F, Mercier I, Walters R, Pavlidis C, Pestell RG, Lisanti MP, Frank PG (2014) Caveolin-1 regulates the anti-atherogenic properties of macrophages. *Cell Tissue Res.* **358**: 821–31.
- Pereira CL, Gonçalves RM, Peroglio M, Pattappa G, D'Este M, Eglin D, Barbosa M a, Alini M, Grad S (2014) The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs. *Biomaterials* **35**: 8144–53.
- Seibel MJ, Cooper MS, Zhou H (2013) Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives. *lancet. Diabetes Endocrinol.* **1**: 59–70.
- Thavaneswaran P, Vandeppeer M (2014) Lumbar artificial intervertebral disc replacement: a systematic review. *ANZ J. Surg.* **84**: 121–7.
- Trampuz A. & Widmer AF (2006) Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**, 349–56

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.813.025
2. Titel van het project : Gecontroleerde lokale afgifte van medicatie voor de behandeling van rugpijn en artrose
3. Titel van de NTS : Medicijnen voor plaatselijke behandeling van rugpijn en artrose

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 26-06-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 13-07-2016 en 26-08-2015  
 anderszins behandeld: per email 10-09-2015  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 16-07-2015 tot 13-08-2015 en  
03-09-2015 tot 10-09-2015 en  
29-09-2015 tot 01-10-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 12-10-2015

## 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 26-08-2015
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: Aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen: zie punt A8.
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Weergave presentatie onderzoeker:

De onderzoekster presenteerde haar project en ging in op de vragen die haar voorafgaand aan het project waren toegestuurd (zie daarvoor vraag A8). Additioneel kwamen de volgende punten aan de orde.

De meest voorkomende rugklachten zijn lage rugklachten en artrose. De huidige behandelingen kosten veel geld en omdat men ouder wordt zal de mens er steeds meer hinder van gaan ondervinden. De behandeling die nu beschikbaar zijn, zijn pijnstilling en allerlei operaties, maar zijn helaas niet afdoende. Bij operaties gaat het om het aanbrengen van prothesen voor gewrichten en prothesen voor tussenwervelschijven. De gewrichtsprothesen zijn slechts voor een bepaalde duur bruikbaar, tussen de 10 en 15 jaar, waarna ze vervangen moeten worden. Voor tussenwervel prothesen treden er nog andere problemen op en ook de duur van het gebruik van deze prothesen is beperkt.

Artrosemodellen en tussenwervel modellen hebben veel overeenkomsten al zijn er ook enkele verschillen, daarom onderzoekt men beide modellen. Biochemisch is het allemaal goed vergelijkbaar en genetisch gezien zijn er ook veel overeenkomsten; de pijnmechanismen zijn bijvoorbeeld vergelijkbaar. Bij beide aandoeningen is gebleken dat plaatselijke medicatie een goede behandeling is.

Het is de bedoeling dat via een injectie een depot met medicatie geplaatst gaat worden welke gecontroleerd afdoende pijnstilling zal afgeven voor een langere periode zodat de patiënt niet om de 3 maanden terug hoeft voor een nieuwe (pijnlijke) injectie. Onderzocht zal worden wat de exacte dosering moet zijn en welke dosering veilig is en voor welke periode dit zal moeten zijn.

In het project wordt gewerkt met 3 niveaus:

- 1) Dit is een Clinical Treatment studie. Dit onderdeel bevat een dose finding studie in de rat en de hond. Er wordt gewerkt met medicatie die FDA goedgekeurd is zodat er een snellere vertaalslag gemaakt kan worden naar de mens. De hond wordt gebruikt als tussenwervelschijf model. Tevens bevat dit deel een efficacy studie met de geit. Reden voor het gebruiken van de geit, in plaats van de hond, berust op haalbaarheid van de uitvoering, zowel financieel als organisatorisch, terwijl translatie van de resultaten naar de 'target species' (hond) geen belemmering vormt. Diergeneeskundig heeft de hond de voorkeur, maar humaan de geit. Omdat de hond en de geit qua grootte ongeveer gelijk zijn zal dezelfde dosering gebruikt kunnen worden. Na de studie met de geit kan de hondenpatiënt gebruikt worden in een proof of principle studie en de een humane studie in de kliniek als fase 1 onderzoek.
- 2) Dit deel is een proof of concept studie met nieuwe targets.
- 3) Dit deel bestaat uit fundamenteel onderzoek om nieuwe targets te identificeren. Met name de relatie tussen inflammatie en regeneratie wordt bestudeerd. Er wordt ook gekeken naar de werking van de afbraak van de biomaterialen en wanneer het veilig is om een nieuwe injectie te geven.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 16-07-2015, 03-09-2015 en 29-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: De DEC mist informatie over onderzoek dat op dit gebied al door andere groepen uitgevoerd is. Graag toevoegen.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De onderzoeksstrategie is niet helder. De DEC ziet graag een duidelijkere opbouw van de verschillende stappen die u wilt nemen in uw onderzoek, waarbij u de keuze voor dier en model onderbouwt. Daarbij begrijpt de DEC de samenhang tussen de verschillende stappen niet goed. Graag herschrijven en toelichten.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De motivatie voor het gebruik van het ████████ model voor de geit mist. Waarom beperkt u zich niet tot de rat? Wat verwacht u nog aan additionele gegevens?

Bijlage 3:

- De DEC begrijpt dat het gebruik van de hond niet goed ligt bij het publiek, maar de DEC vindt dat onvoldoende motivering voor het gebruik van de geit. Wat zou het in aantallen dieren schelen? Bij gebruik van de geit moet een extra translatieslag gemaakt worden.

- Datum: 03-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel:

- Naar aanleiding van uw presentatie is het de DEC nu helder waarom u kiest voor het gebruik van de geit. De DEC verzoekt u ook in het projectvoorstel nog meer aan te scherpen waarom u kiest voor de geit in plaats van de hond (of het paard).

- Datum: 29-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

- In bijlage 2 vraagt u vrouwelijke ratten aan, maar de motivatie daarvoor is onvoldoende. Graag nader motiveren.

- Datum antwoord: 13-08-2015

- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel:

- 3.1, achtergrond: The background has been extended with additional information regarding the field of controlled delivery of biologics for the treatment of osteoarthritis and back pain. Recent work by collaborators highlights the progress achieved in the field of joint cartilage repair with the aid of controlled delivery of biologics (Lam J, Lu S, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of biologics for cartilage repair. Adv Drug Deliv Rev. 2015 Apr;84:123-34). Thus far only a limited number of publications on solid or hydrogel based-systems specifically developed for intra-discal controlled release is present ████████, we have conducted a systemic review on Biomaterials for intervertebral disc regeneration. This work has been resubmitted after minor revision



number of animals and thus would be unable to complete the project as planned and approved by the financing body.

- Datum antwoord: 10-09-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Justification of the choice of the animal model is given.

(a) in the basic outline of the different components and type of procedures:

Goat [REDACTED] model: Optimal dosages in the rat model will be translated towards the goat [REDACTED] model of OA, to determine safety and efficacy before canine and human patients can be treated. The goat [REDACTED] model consists of [REDACTED], due to which a mild osteoarthritis develops over a period of 20 weeks. This model for OA closely resembles human and canine OA, as it does not involve ligament transection or injection of enzymes as done in small animal models, but is based on mechanical damage to the cartilage. The gross anatomy of the goat knee is fairly similar to both canines and humans, and in both canine and human patients the knee is the most frequently affected joint. Additional readout parameters to those used in small animal models will be cartilage tissue degeneration and synovial inflammation, in addition to biochemistry of ECM proteins and cytokines in synovial fluid.

As soon as safety and efficacy has been determined in the large animal models of OA and IVD a first translational step will be undertaken in canine patients treated at the Academic Veterinary Hospital of The Netherlands. Such studies will be performed within the 5-year period of the project. As a spin-off this project, a phase I clinical trial in humans will be feasible as soon as regulatory affairs and transfer of the newly developed treatment into a GMP-environment have been addressed.

(b) This justification is further extended with additional arguments in the revised Appendix-experimental animal procedure no 4 as follows:

In the section of proposed animal procedures: OA tends to develop insidiously, sometimes without evidence of prior injury or a clear inflammatory component and is primarily driven by focal cartilage damage which increases in severity by biomechanical loading. This is best simulated in the [REDACTED] model. This model for OA closely resembles human and canine OA, as it does not involve ligament transection or injection of enzymes as done in small animal models, but is based on mechanical damage to the cartilage.

In section B. The animals: The [REDACTED] model for goats has been set up and validated (manuscript submitted) by the department of Rheumatology and department of Orthopaedics at the UMCU. The gross anatomy of the goat knee is fairly similar to both canines and humans, and in both canine and human patients the knee is the most frequently affected joint. Also in terms of function and biomechanics the goat knee joint resembles the human and canine knee joint more than rats. In horses, an accepted animal for research on regeneration of osteochondral defects, the metacarpophalangeal joint is studied, which is analogous to the human wrist with two layers of carpal bones. However, developing a [REDACTED]



model of the metacarpophalangeal joint in horses would be hampered by the limited access to the dorsal aspect of the metacarpophalangeal joint and the narrowed space between phalanx 1 (P1) and the metacarpus (MC3) and in addition, this is not the joint most affected in either canine or human patients. Although the goat is ruminant and hence not ideal for studying enteral therapies, this project concentrates on local delivery of medication and hence this is not an issue. Goat models have been used as cartilage regeneration models before by the research group. Due to the size, the joint of goats is easily accessible for surgery and multiple read out parameters can be obtained from one animal. Female animals will be used as they are easier to handle and house together. Goats older than 1 year, and hence skeletally mature, will be purchased from a registered Dutch breeder in order not to have issues with skeletal remodelling seen during growth. There is only limited evidence regarding the role of gender hormones in OA in large animal models.

Furthermore, in order to communicate clearly that after the studies in goats (████████ model), studies in both canine and human patients with OA can be initiated, the "coherence of the project" within the main project proposal and the respective appendix has also been adjusted accordingly. This is done as follows within these sections:

.....As soon as safety and efficacy has been determined in the large animal models of OA and IVD, and release kinetics are comprehended, a first translational step will be undertaken in canine patients with OA or IVD disease within the 5-year period of the project. Likewise, a phase I clinical trial in humans will be feasible shortly after completion of the project, as soon as regulatory affairs and transfer of the newly developed treatment into a GMP-environment have been addressed.....

- Datum antwoord: 1-10-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

In bijlage 2 is in overleg met de IvD de onderbouwing voor gebruik van vrouwelijke dieren verder toegelicht als volgt:

We prefer to use female rats for three reasons:

- (1) In order to reduce the number of animals employed we will, where possible, combine the current animal procedure with animal procedure no. 1 (rat OA model) where female mice are employed so that they fit into the micro-CT scanner for analysis knee-bone pathology.
- (2) Male rats can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up.
- (3) In order to reduce variability and make comparisons between experiments possible we will need to concentrate on female rats within this project proposal. Gender is expected not to influence the study. No effects have been described of progesterone on regeneration of tissue by NP cells and only two studies mention that estradiol can protect against induced cell death. As this is very limited and restricted to artificially induced cell death, and in human nor canine patients a connection between gender and disc degeneration was found, also at menopausal age, it is very unlikely that any effect of cycle will be evident.

Verder is bijlage 4 is de onderbouwing van gebruik van vrouwelijke of mannelijke honden ook aangescherpt als volgt:

Regarding the sex of animals: In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients (Smolders et al 2013), hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predilection also for the human population of patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011). In short term studies (range of 3 months) we aim at having a sex ratio of 1:1 in the study cohort in order to have both sexes represented in the study. In long term studies of > 6 months, we preferably work with male dogs in order not to have issues with the cyclus of female dogs. Female dogs have twice a year an oestrus cycle and when not used for breeding castration is advised in order to diminish the risk for development of breast cancer and other complications of irregularities of the cycle, including pseudopregnancy and pyometras, and accidental fertilization can not be excluded during long term housing of the animals. For this reason, female dogs when not used for breeding should be sterilized, which would add another experimental procedure with moderate severity.

#### References:

- Siemionow et al. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. Spine (Phila Pa 1976). 2011 Aug 1; 36(17): 1333–1339.
- Smolders LA et al. Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: chondrodystrophic and nonchondrodystrophic breeds. Vet J. 2013 Mar;195(3):292-9.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

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

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

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

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen en valideren van een nieuwe behandelmethode, waarbij via een injectie anti-inflammatoire medicijnen en/of biomaterialen gecontroleerd worden afgegeven in het gewricht, ter behandeling van artrose en chronische rugpijn bij mens en hond. De behandeling van patiënten met artrose of chronische rugpijn bestaat in eerste instantie uit het slikken van ontstekingsremmers. Deze medicijnen hebben echter, bij langdurig gebruik, meer risico op maagklachten, botontkalking of zelfs hartklachten. De enige andere optie is dan nog een operatie. Bij artrose patiënten wordt het versleten gewricht dan vervangen door een prothese en bij patiënten met chronische rugpijn wordt de versleten discus ofwel vervangen door een prothese of in zijn geheel weggehaald, waardoor de wervels aan elkaar groeien. Deze operaties gaan gepaard met een lange herstelperiode en in veel gevallen herstelt de patiënt niet volledig. Een alternatieve behandeling zou kunnen zijn om een medicijn te verpakken in een biomateriaal en in het versleten gewricht/discus te injecteren, waardoor het medicijn geleidelijk over langere tijd vrij komt, waardoor de ontsteking voor langere tijd geremd wordt en de afbraak van het weefsel van het gewricht of de discus wordt geremd. Door middel van deze deels translationele en deels fundamentele studie kan onderzocht worden of deze techniek een werkzame en veilig toepasbare techniek is en op termijn toepast kan worden in de kliniek bij de mens en de hond.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. 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)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)

- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief in de bijlagen als gevolg van de (be)handelingen in de bijlage varieert van licht tot matig ongerief. Cumulatief komt het ongerief in alle bijlagen op matig. In bijlage 1 is het cumulatieve ongerief matig o.a. als gevolg van het induceren van osteoartritis, het vooraf onderzoeken van het kniegewricht, de force plate metingen, het toedienen van biomaterialen via een injectie in de knie en het euthanaseren van de dieren. In bijlage 2 is het cumulatieve ongerief ingeschat als matig als gevolg van het induceren van degeneratie van de tussenwervelschijf in de staart, het toedienen van injecties onder anesthesie en het euthanaseren van de dieren. Het cumulatieve ongerief in bijlage 3 is ingeschat als matig als gevolg van het induceren van osteoartritis, het toedienen van biomaterialen en het euthanaseren van de dieren. In bijlage 4 is het cumulatieve ongerief als gevolg van het induceren van degeneratie in meerdere tussenwervelschijven, het toedienen van injecties onder anesthesie en het euthanaseren van de dieren ingeschat als matig. En in de vijfde bijlage is het cumulatieve ongerief matig als gevolg van het meten van de kreupelheid, de force plate metingen, bloedafname, diverse injecties met biomaterialen en het euthanaseren van de dieren. De DEC is van mening dat deze ongeriefinschattingen realistisch zijn.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit project wordt onderzocht hoe weefsels reageren op de biomaterialen en de langdurige afgifte van medicijnen. Omdat hiervoor de bloedtoevoer met afweercellen nodig is en activiteit van de lever (vanwege het afbreken en afvoeren van de biomaterialen), kan dit alleen in levende dieren onderzocht worden. De meeste proeven m.b.t. mogelijke toxiciteit en afgifte van de biomaterialen zijn vooraf in in vitro experimenten getest. Ten behoeve van de translatie is het bovendien vereist dat deze nieuwe behandeling getest wordt op proefdieren, eerst in kleine proefdieren, daarna op grote proefdieren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren zijn statistische methoden toegepast. Waar mogelijk worden voor verschillende vraagstellingen dezelfde dieren gebruikt en worden verfijnde laboratoriumtechnieken toegepast, waarmee per dier meer kennis verkregen kan worden. Doordat gebruik wordt gemaakt van MRI en röntgen doorlichting kunnen de processen in het levende dier in de tijd gevolgd worden. Daarnaast worden, indien mogelijk, meerdere discussen per dier (rug en staart) gebruikt i.p.v. slechts één discus, waardoor er minder dieren nodig zijn. Door gebruik te maken van een verfijnde post mortem analyse kunnen meerdere uitleesparameters van elk gewricht bestudeerd worden.

In bijlage 1 en 5 zullen alleen vrouwelijke ratten gebruikt worden omdat mannelijke ratten gedurende de studie en de follow up periode een stuk groter en zwaarder worden, waardoor de knie van mannelijke ratten niet in microCT scanner past. In bijlage 2 zullen eveneens alleen vrouwelijke ratten gebruikt worden. Indien mogelijk zal bijlage 2 gecombineerd worden met bijlage 1, zodat dezelfde dieren gebruikt kunnen worden, wat tot vermindering van het aantal benodigde dieren leidt. Daarnaast nemen mannelijke ratten gedurende de lange termijn experimenten en de follow up periode te veel in gewicht en omvang toe. Een derde reden voor het gebruik van vrouwelijke ratten is gelegen in het feit dat door het gebruik van vrouwelijke ratten de variatie kleiner wordt en het mogelijk is de verschillende experimenten met elkaar te vergelijken. In bijlage 3 zullen alleen vrouwelijke geiten gebruikt worden omdat vrouwelijke geiten beter hanteerbaar zijn en mannelijke geiten moeilijker gezamenlijk te huisvesten zijn, wat van negatieve invloed is op het ongerief voor de geit. En in bijlage 4 zullen voor de korte termijn studies (<3 maanden) vrouwelijke en mannelijke honden gebruikt worden. Voor de lange termijn studies (>6 maanden) worden mannelijke honden gebruikt vanwege de cyclus van vrouwelijke honden. Daarnaast wordt geadviseerd om vrouwelijke honden te steriliseren om de kans op borstkanker en andere onregelmatigheden van de cyclus te verkleinen, wat een extra experimentele handeling met matig ongerief betekent. Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Vanwege de aard van de experimenten zullen adequate pijnbestrijding en humane eindpunten worden toegepast. Om de stress van de ratten te beperken zullen de dieren in bijlage 1 en 5 eerst getraind worden, zodat zij gewend raken aan het hanteren ten behoeve van de bloedafname en de force plate metingen. In bijlagen 1, 2 en 5 worden ratten gebruikt omdat er reeds veel ervaring is met ratten in onderzoek naar artrose en discusslijtage. Hierdoor kunnen onderzoekers de beste doses bepalen en zijn er verfijnde technieken beschikbaar om de afgifte van medicijnen en slijtage te volgen in het levende dier. Geiten zullen in bijlage 3 worden gebruikt om de nieuwe behandelingen en medicijnen voor artrose verder te testen. De ratio voor het gebruik van geiten is gelegen in het feit dat het te gebruiken ████████ model een bekend en gevalideerd model is en de knie van de geit in grote mate vergelijkbaar is met die van de mens en de hond. In bijlage 4 zullen honden gebruikt worden voor het verdere onderzoek naar discusslijtage. Met honden is veel ervaring in onderzoek naar discusslijtage. Daarnaast dient de hond als 'doeldier' omdat discusslijtage ook bij honden optreedt en deze vorm van slijtage vergelijkbaar is met de slijtage zoals die bij mensen voorkomt.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het ontwikkelen en valideren van een nieuwe behandelmethode, waarbij via een injectie anti-inflammatoire medicijnen en/of biomaterialen gecontroleerd worden afgegeven in het gewricht, ter behandeling van artrose en chronische rugpijn bij mens en hond, substantieel is. Ten gevolge van de inductie van osteoartritis en degeneratie van de tussenwervelschijf in de staart dan wel de rug treedt bij een aanzienlijk deel van de dieren matig ongerief op, maar de DEC is van mening dat voor de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de verschillende (be)handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. De DEC heeft gediscussieerd over het gebruik van het [REDACTED] model in de geit en is na overleg met de onderzoeker van mening dat het [REDACTED] model noodzakelijk is om de translatie van de rat naar de mens dan wel de hond te maken en de geit daarvoor het meest geschikte diermodel is. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is nog niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren, en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar. De onderzoekers hebben goed beargumenteerd waarom zij in dit onderzoek alleen vrouwelijke ratten en geiten en vrouwelijke dan wel mannelijke honden willen gebruiken. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het ten hoogste matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015282

**Bijlagen**

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015282. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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



Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2015  
Geplande einddatum: 30 augustus 2020  
Titel project: Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases  
Titel niet-technische samenvatting: Medicijnen voor plaatselijke behandeling van rugpijn en artrose  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 15 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015282

**Bijlagen**

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 19 oktober 2015

Vervaldatum: 18 november 2015

Factuurnummer: 15700282

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015282	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht  
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht

██████████

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015282

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 2 november 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████, leden van IvD Utrecht,

Op 13 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint disease' met aanvraagnummer AVD108002015282. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben.

Deze brief sturen wij u om enerzijds nadere toelichting te vragen over enkele inhoudelijke onduidelijkheden en anderzijds om met u van gedachte te wisselen over argumentatie die u in uw projectaanvraag aanvoert. Wij zouden graag zien dat u zich beperkt tot uitsluitend wetenschappelijk onderbouwde argumentatie van uw keuzes.

Wij willen u vragen om de volgende vragen inhoudelijk toe te lichten:

U beargumenteert in bijlage dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dat u vrouwelijke ratten in wilt zetten omdat mannelijke dieren gedurende het experiment teveel in gewicht toenemen om in de micro CT scan geplaatst te worden. Uit de tekst maken wij op dat dit probleem zich alleen voordoet bij de laatste post mortem meting (niet bij  $t=-4$  en  $t=0$ ). Kunt u meer uitwerken waarom het niet mogelijk is om, gezien dit een post mortem meting betreft alleen de achterpoot of het kniegewricht te scannen?

U beschrijft het individueel huisvesten van de geiten in bijlage 3.4.4.3, u beschrijft dat de dieren kreupel of licht verlamd zijn na de operatie en dat het individueel huisvesten nodig is om complicaties met wondgenezing te voorkomen. De door u beschreven kooiverrijking als autobanden en ballen lijken voor dieren met dergelijk letsel niet van nut in relatie met de beschreven klinische verschijnselen en dus niet voor verlichting van het ongerief van de individuele huisvesting te zorgen. Kunt u deze keuze nader toe lichten of eventueel andere keuzes beschrijven?

Kunt u nader toelichten hoe de dierproeven uit bijlage 3.4.4.5 in de strategie van het project zijn opgenomen? Uit het door u bijgevoegde schema lijkt het alsof u deze dierproeven uitvoert voor u aanvangt met de dierproeven uit de bijlagen 3.4.4.1 t/m 3.4.4.4. Uit de beschrijving van bijlage 3.4.4.5 menen wij op te maken dat u deze dierproeven uitvoert met componenten die succesvol zijn gebleken in de dierproeven uit de bijlagen 3.4.4.1 t/m 3.4.4.4. Graag zien wij dit beter uitgelegd.

In meer algemene termen zouden wij met u van gedachten willen wisselen over het onderstaande:

U voert in de bijlagen dierproeven op dat de controle door de onderzoeker en het wegen van de dieren wordt gezien als verrijking. Wij vragen ons af of dit voor ratten het geval is aangezien dit in de lichtperiode plaatsvindt en dus eerder als een verstoring kan worden gezien. Voor de geiten en honden kan dit gelden mits dit niet plaatsvindt in de periode net na de operatie en het klinisch onderzoek mogelijk pijn veroorzaakt en u werkelijk tijd besteedt aan socialisatie van de dieren.

Wij willen u vragen deze generieke formulering in de bijlagen te heroverwegen en in elk geval per bijlage meer te specificeren of te verwijderen.

In bijlage dierproeven 3.4.4.4 beargumenteert u dat de voorkeur uitgaat naar mannelijke dieren voor de experimenten die langer dan 6 maanden duren omdat de cyclus van teven interfereert met de uitvoer van het experiment. U beschrijft daarna de noodzaak om teven te steriliseren om de ontwikkeling van borsttumoren en schijnvrucht te voorkomen. Gezien de looptijd van het experiment, de honden zijn bij aanvang van het experiment max. 3 jaar oud, lijkt het ontwikkelen van borsttumoren niet veelvoorkomend. Wij willen u vragen uw argumentatie van de noodzaak van steriliseren met bijkomend extra ongerief voor de teven te heroverwegen. Daarnaast is deze argumentatie is ons inziens niet van toepassing in uw overweging om alleen mannelijke dieren in te zetten. De noodzaak om enkel mannelijke of enkel vrouwelijke dieren in te zetten lijkt volgens uw beschrijving alleen een praktische achtergrond te hebben. Zou u willen toelichten of u kunt overwegen om voor de kortdurende experimenten ( 3 maanden) alleen vrouwelijke dieren in te zetten in plaats van 1:1 zoals nu beschreven en voor de experimenten die < 6 maanden duren mannelijke dieren in te zetten?

U beargumenteert in bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dat de voorkeur uitgaat naar vrouwelijke ratten omdat deze makkelijker te hanteren zijn dan mannelijke ratten. Dit is een persoonlijke voorkeur en wij willen u vragen deze stelling te heroverwegen.

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

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

#### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



**Datum**

29 oktober 2015

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD108002015282

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlage:**

formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Betreft: response op vragen CCD over AVD108002015282

Utrecht, 11 november 2015

Geachte leden van de Centrale Commissie voor Dierproeven,

Op 2 november 2015 hebben wij uw response op een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project 'Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint disease' met aanvraagnummer AVD108002015282. In uw brief bleek nadere toelichting nodig te zijn op enkele inhoudelijke onduidelijkheden. Er werd verzocht om van gedachten te wisselen over argumentatie die gebruikt werd in de aanvraag. Tevens heeft de DEC-Utrecht omtrent deze aanvraag ook een brief ontvangen waarin om nadere toelichting gevraagd werd.

Naar aanleiding van uw verzoek is een vergadering belegd waarbij de voorzitter van de DEC-Utrecht, de verantwoordelijke onderzoeker en de IvD-Utrecht aanwezig waren. Uw punten zijn uitvoerig besproken. Deze brief sturen wij u om enerzijds nadere toelichting te geven over de inhoudelijke onduidelijkheden en anderzijds om onze argumentatie uit te leggen. In de bijlage treft u puntsgewijs de toelichting op de vragen die de CCD gesteld heeft. Hierin worden ook de bijbehorende wijzigingen in de formulieren aangegeven met rode tekst. Tevens zijn de gewijzigde documenten van de aanvraag bijgesloten.

Betreffende uw punt over het gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren in dierproeven zoals beschreven onder 3.4.4.4 in deze aanvraag (AVD108002015282): hierover is tijdens de vergadering gesproken. In projectvoorstel AVD108002015285 (ook onlangs bij de CCD ingediend) worden alleen vrouwelijke dieren ingezet waarbij stamcellen gebruikt worden in de regeneratieve strategie. Aangezien het geslacht geen invloed lijkt te hebben op het hebben van tussenwervelschijfslijtage, kunnen in de overige experimenten binnen het project AVD108002015285, dat parallel wordt uitgevoerd, meer mannelijke dieren ingezet worden. Hiermee kan de onderzoeker zorgen dat beide geslachten gebruikt worden en bij de leverancier geen overschot van mannelijke dieren ontstaat.

We hopen uw hiermee voldoende te hebben geïnformeerd,

Hoogachtend,

[Redacted signature]

[Redacted name and title]

Utrecht University

[Redacted contact information]

## Betreft: puntsgewijs response op vragen van aanvraag AVD108002015282

*U beargumenteert in bijlage dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dat u vrouwelijke ratten in wilt zetten omdat mannelijke dieren gedurende het experiment teveel in gewicht toenemen om in de micro CT scan geplaatst te worden. Uit de tekst maken wij op dat dit probleem zich alleen voordoet bij de laatste post mortem meting (niet bij  $t=-4$  en  $t=0$ ). Kunt u meer uitwerken waarom het niet mogelijk is om, gezien dit een post mortem meting betreft alleen de achterpoot of het kniegewricht te scannen?*

Dit project onderzoekt de locatie- en ziekte-afhankelijke afgifte van medicatie van het geladen biomateriaal. De lading van het biomateriaal met de specifieke factoren wordt bepaald op basis van geschatte volume van de locatie (in dit geval de kniegewricht/tussenwervelschijf) en het distributie volume van het dier zelf. Deze twee parameters zijn afhankelijk van de grootte/gewicht van het dier. Vrouwelijke en mannelijke ratten op dezelfde leeftijd hebben een duidelijk verschil in grootte/gewicht, en inherent eraan ook verschillen in volume van kniegewricht/tussenwervelschijf. Door beide geslachten in het onderzoek te gebruiken introduceren we extra variabelen (volume van knie/tussenwervelschijf en distributie volume van het dier) en daardoor een grotere standaard deviatie in de primaire read out. Dit project heeft niet als doel het finetunen van een dosering op basis van volume locatie (knie/tussenwervelschijf) en gewicht van de patiënt. Voordat deze twee parameters onderzocht kunnen worden, moeten we eerst beter begrijpen hoe [REDACTED] op zichzelf invloed hebben op de afgifte van medicatie. **Door alleen een geslacht te gebruiken, beperken we de variabelen tot de dosering die geladen is op het afgifte systeem en locatie/ziekte. Hiermee kunnen we de vraagstelling van het project beantwoorden met een beperkt aantal dieren.**

**In dierproef 3.4.4.1** gaat onze voorkeur uit naar vrouwelijke dieren omdat

- (a) we reeds een experiment afgerond hebben met vrouwelijke ratten in een vergelijkbare proef zoals beschreven in 3.4.4.1. De studie is uitgevoerd om te kijken welke doseringsrange geschikt is voor twee anti-inflammatoire factoren [REDACTED] en [REDACTED]. De eerste proef binnen dit project aanvraag, is een vervolgstudie waarbij we binnen de gekozen range van medicatie de dosering verder verfijnen en de bijeffecten onderzoeken. Om de nieuwe verkregen data goed te kunnen interpreteren is het van belang dat we gebruik kunnen maken van de reeds verkregen historische data.
- (b) gedurende het onderzoek (ante mortem) worden dieren wekelijks onderzocht door middel van de "pressure plate" (Incapacitance meter). Hiermee kunnen we de gewichtsverdeling in de achterpoten onderzoeken. Dit is een objectieve maat van belasting van de behandelde achterpoot. Onze studie loopt door voor een periode van 12-30 weken na injectie om de lange termijn effecten te onderzoeken. Vrouwelijke dieren passen in dit onderzoekssysteem gedurende de gehele periode van het onderzoek, terwijl mannelijke dieren in de tweede helft van de periode (vanaf 12 weken en later) zodanig gegroeid zijn dat ze niet meer goed in de pressure plate opstelling passen en de meting onbetrouwbaar verloopt (zie figuur voor voorbeeld).



Pressure plate (Incapacitance meter): Links: een vrouwelijke rat die goed in de opstelling staat. Het is de bedoeling dat de rat met elke poot op een sensor staat en dat er verder geen gewicht op de sensor geplaatst wordt. Er is daarom ook een gat voor de staart in de achterkant, zodat het dier die niet op de sensoren kan positioneren. Rechts: Als een rat te groot is, dan zit hij klem in het bakje en zal hij of met zijn hele lijf op de sensoren rusten, of hij hangt als het ware tussen de zijanten. Beide scenario's zorgen voor onbetrouwbare meetresultaten. Hier ziet u een mannelijke rat in het begin van de studie. Na 1,5 maand zijn ze ruim 100 gram zwaarder (van 430 naar 560 gram) en kan de meting niet betrouwbaar uitgevoerd worden.

(c) micro-CT scan wordt in procedure 3.4.4.1 inderdaad post-mortem uitgevoerd. Direct na euthanasie en voordat rigor mortis optreed, worden de dieren in een liggende houding bevestigd met de knieën parallel aan elkaar, gestrekt en met de patella in de juiste positie. Hiermee kunnen we op een gestandaardiseerde manier de achterpoten fixeren en scannen in de micro-CT. Door de gestandaardiseerde positionering bereiken we minder standaard deviatie in de metingen van de microstructuren die onderzocht wordt door middel van de microCT. In een eerder experiment met mannetjesdieren hebben wij ondervonden dat 11 en 16 weken na injectie met microsferen niet meer mogelijk was deze dieren onder de micro-CT te leggen. Hoewel we in 3.4.4.1 van deze aanvraag uitgaan van metingen op t-4, t0 en t12-30 weken na injectie en dus alleen de poten van de dieren post mortem gescand zouden kunnen worden, lopen wij het risico bij het gebruik van mannetjes dat wanneer uit het dan lopende onderzoek blijkt dat het beter is een tussentijdstip te incorporeren, dit niet mogelijk zal zijn om longitudinaal uit te voeren in het zelfde dier. Zo'n overweging zouden we maken wanneer blijkt dat er verschillen de osteophyt formatie te zien zijn en dat osteophyt formatie zo uitgebreid is dat het ook intra-articulair te vinden is. In het laatste is het van belang dat we in een vroegere stadium kijken waar de osteophyt-formatie begint en of dit gerelateerd is aan de artrose of aan het intra-articulair injecteren van het biomateriaal+medicatie.

Indien we een eerder tijdpunt nemen en ook mannetjes in de studie hebben lopen, zijn we genoodzaakt om dubbel zo veel mannetjes gebruiken om post-mortem microCT scan te kunnen doen van de achterpoten. Een alternatief hierop is alsnog op alleen vrouwtjesdieren overgaan om minder dieren te gebruiken en longitudinaal de metingen te doen. Tevens, ivm verschillen in grote van dier (mannelijk vs vrouwelijk) en, inherent eraan, verschillen in volume van knie en distributie volume in het lichaam die invloed hebben op de gecontroleerde afgifte van medicatie, is het niet wenselijk om mannetjes te gebruiken voor vroege tijdstippen en vrouwtjes voor de latere tijdstippen van de studie. Dit aspect wordt nu beter uitgelegd in de aangepaste versie van 3.4.4.1 en 3.4.4.2 als volgt:

"Post mortem:

- In the initial studies microCT will be performed to assess radiologic changes in the knee joints at the end of the experiment (between 12-30 weeks after injection). Knee joints that have received a specific treatment will be compared to knee joints that have received a sham treatment. **It may appear necessary to incorporate an earlier time point in the study to detect radiologic changes in the knee joint and define the initiating event. Ideally, these changes are followed up in a longitudinal manner. In that case, micro-CT scan will be conducted with the rats under anaesthesia to minimize the number of animals used.** "

**In dierproef 3.4.4.2** worden ook vrouwelijke dieren geprefereerd. In het kader van proefdiergebruik verminderen zijn er studies gepland waar dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 gecombineerd worden in een en hetzelfde dier om hiermee dieren te verminderen zonder het ongerief toe te laten nemen. Een voorbeeld hiervan zijn de studies beschreven onder 3.4.4.5. Ook voor dierproef 3.4.4.2 is het van belang dat de staart uniform en gestandaardiseerd gepositioneerd wordt om de standaard deviatie van de gemeten microstructuren (zoals discushoogte en trabekeldikte en -richting) te verminderen.

Dit wordt nu beter toegelicht in sectie A van 3.4.4.2 als volgt: "Post-mortem: Radiography and micro-computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors. Thereafter, rat tails will be harvested and IVDs will be accordingly processed for biochemical analyses of the tissues and/or after macroscopic evaluation will be fixed, decalcified, and thereafter subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and immunohistochemical stainings). **It may appear necessary to incorporate an earlier time point in the study to detect radiologic changes in the IVD and surrounding tissues and define the initiating event. Ideally, these changes are followed up in a longitudinal manner. In that case, micro-CT scan will be conducted with the rats under anaesthesia to minimize the number of animals used.**"

Sectie B van 3.4.4.2. is als volgt aangepast:

"We prefer to use female rats for three reasons:

(1) in order to reduce the number of animals employed we will, where possible, combine the current animal procedure with animal procedure no. 1 (rat OA model) where **female mice are employed so that they fit into the micro-CT scanner and the incapacitance meter for analysis knee-bone pathology and for load distribution of the hind legs in the OA model, respectively.**

(2) male rats can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up **and will not allow longitudinal measurements of the microstructures of the tail in a longitudinal manner.**

(3) in order to reduce variability and make comparisons between experiments possible we will need to concentrate on female rats within this project proposal. **Note that male and female rats differ in dimensions of their skeleton. The loading dose of the medication in the biomaterial platform that will effectuate controlled release of the medication is calculated based on an estimation of the volume of the IVD and the distribution volume of the total body. Given that the main aim of this project is dose finding and efficacy and is further exploring the effect of location (knie/IVD) and disease (healthy/degenerated), we concentrate on one gender to exclude the variable of volume distribution and achieve hereby reduction in the standard deviation of the primary read out parameters. The effect of volume distribution (local and total body) will be the topic of follow up projects that will concentrate on fine tuning the translation towards humans and dogs in the clinic."**

*U beschrijft het individueel huisvesten van de geiten in bijlage 3.4.4.3, u beschrijft dat de dieren kreupel of licht verlamd zijn na de operatie en dat het individueel huisvesten nodig is om complicaties met wondgenezing te voorkomen. De door u beschreven kooiverrijking als autobanden en ballen lijken voor dieren met dergelijk letsel niet van nut in relatie met de beschreven klinische verschijnselen en dus niet voor verlichting van het ongerief van de individuele huisvesting te zorgen. Kunt u deze keuze nader toe lichten of eventueel andere keuzes beschrijven?*

In bijlage 3.4.4.3 beschrijven we dat dieren kreupel kunnen zijn (=lameness) en niet dat ze licht verlamd zijn na de operatie. Inderdaad, in de periode direct na operatie (inductie van artrose) zal de kooiverrijking niet aangereikt worden. Nadat de hechtingen zijn verwijderd, dat wil zeggen 7 dagen na de operatie, zal de kooiverrijking zoals beschreven aangereikt worden en functioneel kunnen zijn.

Het text in "sectie D' is aangepast als volgt: "...They are only housed separately immediately after induction of the OA **and enrichment, including car tires and balls, will be withheld from them,** in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, **except for the immediate post-operative period of 7 days,** animals are given toys as enrichment, including licking stones, car tires, and balls. ~~Animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment.~~ All **intraarticular** injections will be done by a veterinarian diplomate of the ~~European College of Veterinary Surgeons~~ with expertise in orthopaedics."

The sentence "Animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment" is verwijderd aangezien we de geiten na inductie van artrose alleen onderzoeken in het kader van gezondheids- and pijnmanagement.

Het tekst in "sectie I" is aangepast als volgt:

Describe which other adverse effects on the animal's welfare may be expected: "In the goat, unilateral OA is induced and hence moderate unilateral lameness is expected to occur. Immediately after induction of OA, animals will receive pijn medication over the course of the 1<sup>st</sup> week for pain relief **and enrichment is temporarily removed (car tires and balls are removed for a maximum of 7 days; licking stones remain in place).** Other adverse effects that may occur is delayed or complicated wound healing."

*Kunt u nader toelichten hoe de dierproeven uit bijlage 3.4.4.5 in de strategie van het project zijn opgenomen? Uit het door u bijgevoegde schema lijkt het alsof u deze dierproeven uitvoert voor u aanvangt met de dierproeven uit de bijlagen 3.4.4.1 t/m 3.4.4.4. Uit de beschrijving van bijlage 3.4.4.5 menen wij op te maken dat u deze dierproeven uitvoert met componenten die succesvol zijn gebleken in de dierproeven uit de bijlagen 3.4.4.1 t/m 3.4.4.4. Graag zien wij dit beter uitgelegd.*

De dierproeven in bijlage 3.4.4.5 zijn onderdeel van Objective 3 waar we onderzoek doen naar het effect van locatie en ziekte op de kinetiek van afgifte van verscheidene biomaterial-platformen. Hiermee kunnen we beter begrepen hoe lokatie (bv knie of tussenwervelschijf) en hoe ziekte (gezond vs verslijten) invloed hebben op de afgifte. Dit zal ons helpen bij het verder verfijnen van de systemen voor verder gebruik bij regeneratieve geneeskunde. Dit objective bevat een *in vitro* gedeelte dat niet verbonden is in de tijd met de *in vivo* studies beschreven onder Objective 1 & 2. Om diergebruik te verminderen, hebben we gekozen om eerst binnen Objective 1 te kijken naar de optimale dosering die een positief effect heeft op artrose en tussenwervelschijfslijtage en daarna

deze dosering te gebruiken om het effect van locatie en ziekte verder te onderzoeken. In de Appendix van het project voorstel, de pijl tussen Objective 3 "Biomaterial release kinetics & degradation" en Objective 1&2 illustreert niet een "tijds-afhankelijkheid". De pijl illustreert dat dit objective inhoudelijk zal bijdragen aan het verfijnen van de efficacy studies bij de grote diermodellen en klinische patiënten.

Om dit helderder te communiceren is de legenda van het schema aangepast als volgt: "In addition, general information on the aspects of local controlled release will be answered by studying release by biomaterials loaded with labels at different body locations and disease stages ("Biomaterial release kinetics & degradation"). **These studies will help fine tune the delivery systems for the efficacy studies in large animal models and clinical patients**".

*In meer algemene termen zouden wij met u van gedachten willen wisselen over het onderstaande: U voert in de bijlagen dierproeven op dat de controle door de onderzoeker en het wegen van de dieren wordt gezien als verrijking. Wij vragen ons af of dit voor ratten het geval is aangezien dit in de lichtperiode plaatsvindt en dus eerder als een verstoring kan worden gezien. Voor de geiten en honden kan dit gelden mits dit niet plaatsvindt in de periode net na de operatie en het klinisch onderzoek mogelijk pijn veroorzaakt en u werkelijk tijd besteedt aan socialisatie van de dieren. Wij willen u vragen deze generieke formulering in de bijlagen te heroverwegen en in elk geval per bijlage meer te specificeren of te verwijderen.*

Ratten: De onderzoekers zullen in de periode voorafgaand aan het experiment de dieren habitueren aan de handelingen die ze ondergaan tijdens de studie (wegen en pressure plate) zodat de dieren minder stress ervaren tijdens de studie en de metingen betrouwbaar verlopen. Na inductie van artrose of tussenwervelschijfslijtage zullen de handelingen bij de ratten zich beperken tot handelingen die gerelateerd zijn aan de read out parameters van de onderzoeksvraagstelling.

Geiten & Honden: Inderdaad de onderzoekers werken aan socialisatie van de dieren met de mens gedurende het gehele onderzoek. Dit begint voorzichtig al tijdens de eerste twee weken van acclimatisatie, zodat de dieren minder stress ervaren gedurende het onderzoek. Rondom de direct postoperatieve periode (7 dagen na inductie van slijtage knie of tussenwervelschijf) worden deze handelingen beperkt tot wat strikt noodzakelijk is voor de gezondheid van het proefdier om onnodig ongerief te voorkomen.

Dit aspect is verder gespecificeerd en aangepast als volgt:

3.4.4.1: "Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups. They will be trained prior to the experiment to get used to handling, **weighing**, fixation for blood collection (in a so-called blood collection 'sleeve') and pressure plate measurements. The first week after OA induction, the rats will be checked daily and if necessary, extra analgesia will be given **animal handling is limited to the necessary handling in relation to health and pain management**. ~~Furthermore, animals are given cage enrichment and the animals are often examined and weighed by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment."~~

3.4.4.2: "Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one day post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, animals are given cage enrichment ~~and the animals are often examined and weighed by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment~~. In order to decrease the stress levels of the rats, they will be trained to get used to handling and blood collection. Moreover, the rats receive proper analgesia after induction of IVD degeneration, to inhibit acute pain. If necessary, analgesia will be continued. **During the experiment animal handling is limited to the necessary handling in relation to health and pain management**. Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, and imaging are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI). The body weight of the rats will be recorded weekly to obtain an impression of the overall health and wellbeing of the animal."

3.4.4.3: "Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 2 weeks, they are housed in groups, freely walking in pens of approximately 20 square meters. There will be no dietary restrictions and the goats will have access to water ad libitum. They are only housed separately immediately after induction of the OA **and enrichment, including car tires and balls withheld from them**, in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, **except**



for the immediate post-operative period of 7 days, animals are given toys as enrichment, including licking stones, car tires, and balls. ~~Animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment.~~ All injections will be done by a veterinarian diplomate of the European College of Veterinary Surgeons with expertise in orthopedics. ~~Except for the post-operative period of 7 days after induction of OA, animal care-takers and the researcher spend time with the animals during general, orthopaedic examination, and weighing; this helps the animals to socialize and experience less stress during the regular follow-ups throughout the study. During the direct-post-operative period animal handling is limited to the necessary handling in relation to health and pain management"~~

3.4.4.4: "Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one week post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, ~~except for the direct post-operative period of 7 days,~~ animals are given toys as enrichment and are allowed to be for at least one hour outside their wards in order to play. Furthermore, animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment. ~~Specifically for the direct post-operative period, animal handling is limited to the necessary handling in relation to health and pain management.~~ Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, imaging and force plate analysis are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), neurology (ECVN), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI)."

3.4.4.5: "Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups. They will be trained prior to the experiment to get used to handling, fixation for blood collection (in a so-called blood collection 'sleeve') and pressure plate measurements.

Furthermore, animals are given cage enrichment. ~~During the experiment animal handling is limited to the necessary handling in relation to health and pain management. and the animals are often examined and weighed by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment."~~

*In bijlage dierproeven 3.4.4.4 beargumenteert u dat de voorkeur uitgaat naar mannelijke dieren voor de experimenten die langer dan 6 maanden duren omdat de cyclus van teven interfereert met de uitvoer van het experiment. U beschrijft daarna de noodzaak om teven te steriliseren om de ontwikkeling van borsttumoren en schijndracht te voorkomen. Gezien de looptijd van het experiment, de honden zijn bij aanvang van het experiment max. 3 jaar oud, lijkt het ontwikkelen van borsttumoren niet veelvoorkomend. Wij willen u vragen uw argumentatie van de noodzaak van steriliseren met bijkomend extra ongerief voor de teven te heroverwegen. Daarnaast is deze argumentatie is ons inziens niet van toepassing in uw overweging om alleen mannelijke dieren in te zetten. De noodzaak om enkel mannelijke of enkel vrouwelijke dieren in te zetten lijkt volgens uw beschrijving alleen een praktische achtergrond te hebben.*

Inderdaad worden schijndracht, pyometra en borsttumoren voornamelijk gezien bij dieren ouder dan 6 jaar en de kans dat vrouwelijke intacte dieren rond de leeftijd van 3 jaar dit soort klachten krijgen is klein. Daarbij zijn er ook praktische overwegingen bij het inzetten van enkel vrouwelijke of mannelijke dieren en is er geen wetenschappelijke achtergrond; tussenwervelschijfslijtage wordt niet beïnvloedt door geslacht. De onderzoeker wil hier graag nog het volgende onder de aandacht brengen: een gemiddelde studie met 6 honden waar alle read out parameters verzameld worden kost ~90.000€. Hierbij is het van belang dat het onderzoek niet het risico van complicaties loopt. Daarom worden ook praktische aspecten overwogen in de keuze van het geslacht bij lange termijn studies.

Onder B, is formulier 3.4.4.4 als volgt aangepast:

"In short term studies (range of 3 months) we aim at having a sex ratio of 1:1 ~~in the study cohort~~ in order to have both sexes represented in the **project**. In long term studies of > 6 months, we preferably work with male dogs in order not to have issues with the cyclus of female dogs. Female dogs have twice a year an oestrus cycle and when not used for breeding castration is advised in order to diminish the risk for development of breast cancer and other complications of irregularities of the cycle, including pseudopregnancy and pyometras, and accidental fertilisation can not be excluded during long term housing of the animals. ~~For this reason, female dogs when not used for breeding should be sterilised, which would add another experimental procedure with moderate severity. "~~

*Zou u willen toelichten of u kunt overwegen om voor de kortdurende experimenten ( 3 maanden) alleen vrouwelijke dieren in te zetten in plaats van 1:1 zoals nu beschreven en voor de experimenten die < 6 maanden duren mannelijke dieren in te zetten?*

Mannelijke dieren zijn groter, hebben grotere tussenwervelschijven dan vrouwelijke dieren. Indien beide geslachten in een proef genomen worden, zorgt dit voor toename van het aantal variabelen en daarmee toename van de standard deviatie van de primaire read out parameters: het volume van de tussenwervelschijf en het distributie volume van de medicatie is afhankelijk van de grootte/gewicht van het dier. Inherent hieraan, zullen deze variabelen invloed hebben op het profiel van afgifte van de medicatie vanuit de biomateriaal platform en het lokale effect op weefsel niveau. Het doel van dit project is om de juiste dosering te identificeren en te begrijpen hoe het ziekte proces invloed heeft op de afgifte en indirect dus ook effect heeft op weefsel niveau. Om deze reden, is het in een longitudinale studie onwenselijk om voor het eerste meetpunt vrouwelijke dieren te gebruiken en voor tweede meetpunt mannelijke dieren. Deze zullen niet met elkaar te vergelijken zijn en daarnaast zal de wetenschappelijke output niet te publiceren zijn. Dit laatste is ook een aandachtspunt binnen de ethische afweging. Daarom voor korte termijn studies zullen we met 1:1 verhouding werken waar bv vrouwelijke dieren voor medicatie A gebruikt worden en mannelijke dieren voor medicatie B. Hiermee kunnen we wel binnen de vrouwelijke dieren de dose response onderzoeken voor medicatie A; hetzelfde geldt voor medicatie B. Medicatie A en B worden niet met elkaar vergelijken.

*U beargumenteert in bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dat de voorkeur uitgaat naar vrouwelijke ratten omdat deze makkelijker te hanteren zijn dan mannelijke ratten. Dit is een persoonlijke voorkeur en wij willen u vragen deze stelling te heroverwegen.*

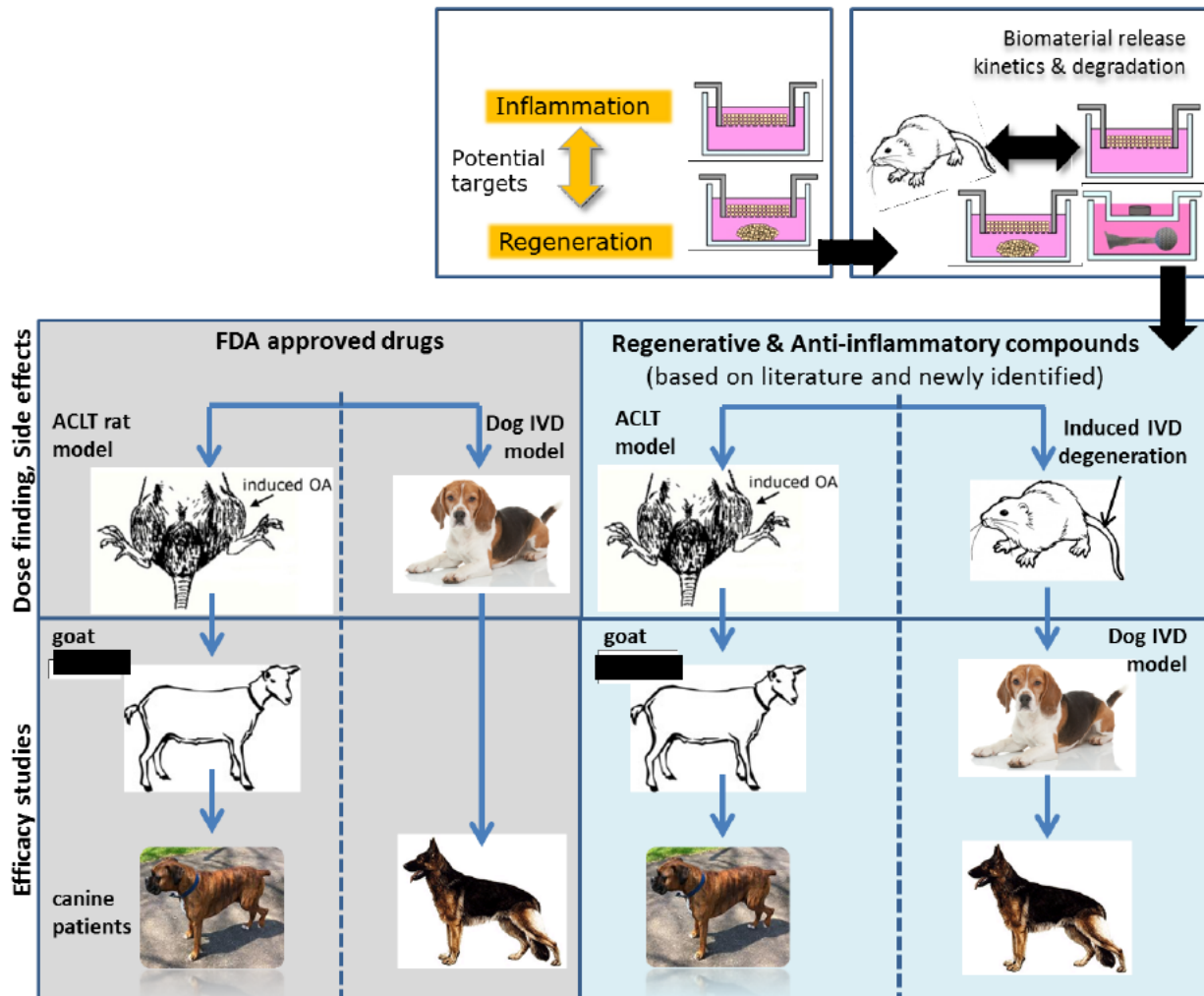
Deze stelling is verwijderd uit het project voorstel.

Project: 2015.II.813.025

Title: Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases

Appendix: Coherence of the project

This project pursues biological repair of the diseased joint and IVD by combing both translation and basic research. The coherence between the different components and the different steps of the projects is illustrated in the figure.



**Figure legend:** Animal studies largely consist of two distinct stages;

1) in small animals where proof of principle and therapeutic window (safety and optimal effectivity) will be determined and 2) large animals, where the effects in large and more clinically relevant models are being studied. As soon as safety and efficacy has been determined in the large animal models of OA and IVD, and release kinetics are comprehended, a first translational step will be undertaken in canine patients with OA or IVD disease within the 5-year period of the project. Likewise, a phase I clinical trial in humans will be feasible shortly after completion of the project, as soon as regulatory affairs and transfer of the newly developed treatment into a GMP-environment have been adressed

Therapeutic compounds that will be applied in animal study stages will have followed three different preceding trajectories;

- 1) FDA-approved drugs that have already been shown to be active in the clinic will directly enter the first stage,
- 2) compounds that have shown proof of principle in literature and
- 3) newly identified targets in the projects' fundamental research part, after validation in vitro of effectivity and optimal release profiles.

In addition, general information on the aspects of local controlled release will be answered by studying release by biomaterials loaded with labels at [redacted] and [redacted] ("Biomaterial release kinetics & degradation"). These studies will help fine tune the delivery systems for the efficacy studies in large animal models and clinical patients

## References used in the project proposal

- Bellamy N, Campbell J, Welch V, TI G, Bourne R, Ga W (2009) Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. The Cochrane Library. 2; 1-120
- Blanquer SB, Sharifi S, Grijpma DW (2012) Development of poly(trimethylene carbonate) network implants for annulus fibrosus tissue engineering. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**: 177–184.
- Gawri R, Antoniou J, Ouellet J, Awwad W, Steffen T, Roughley P, Haglund L, Mwale F, Hospital RV, Scoliosis M, Arabia S (2013) BEST PAPER NASS 2013 : LINK-N CAN STIMULATE PROTEOGLYCAN SYNTHESIS.
- Hamilton DF, Howie CR, Burnett R, Simpson a HRW, Patton JT (2015) Dealing with the predicted increase in demand for revision total knee arthroplasty: challenges, risks and opportunities. *Bone Joint J.* **97-B**: 723–728.
- Higashino K, Hamasaki T, Kim JH, Okada M, Yoon ST, Boden SD, Hutton WC (2010) Do the adjacent level intervertebral discs degenerate after a lumbar spinal fusion? An experimental study using a rabbit model. *Spine (Phila. Pa. 1976).* **35**: E1144–52.
- Imai Y, Okuma M, An HS, Nakagawa K, Yamada M, Muehleman C, Thonar E, Masuda K (2007) Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine (Phila. Pa. 1976).* **32**: 1197–205.
- Jacobs WCH, Rubinstein SM, Koes B, van Tulder MW, Peul WC (2013) Evidence for surgery in degenerative lumbar spine disorders. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **27**: 673–84.
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG (2012) A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science* **336**: 717–21.
- Lam J, Lu S, Kasper FK, Mikos AG (2015) Strategies for controlled delivery of biologics for cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **84**: 123–34.
- Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**: 2197–223.
- Pavlidis S, Gutierrez-Pajares JL, Katiyar S, Jasmin J-F, Mercier I, Walters R, Pavlidis C, Pestell RG, Lisanti MP, Frank PG (2014) Caveolin-1 regulates the anti-atherogenic properties of macrophages. *Cell Tissue Res.* **358**: 821–31.
- Pereira CL, Gonçalves RM, Peroglio M, Pattappa G, D'Este M, Eglin D, Barbosa M a, Alini M, Grad S (2014) The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs. *Biomaterials* **35**: 8144–53.
- Seibel MJ, Cooper MS, Zhou H (2013) Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives. *lancet. Diabetes Endocrinol.* **1**: 59–70.
- Thavaneswaran P, Vandeppeer M (2014) Lumbar artificial intervertebral disc replacement: a systematic review. *ANZ J. Surg.* **84**: 121–7.
- Trampuz A. & Widmer AF (2006) Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**, 349–56

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 10 november 2015 22:04  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**Onderwerp:** Fwd: aanhouden beoordelen AVD108002015280  
**Bijlagen:** AVD108002015282 aanhouden beoordelen.doc; ATT00001.htm

**Categorieën:** Dossier [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Dezer dagen hebt U het antwoord ontvangen van de onderzoeker op de vragen door U gesteld over boven genoemd project. U vraagt in uw brief ook naar de visie van de DEC Utrecht en ik wil daar gaarne kort op ingaan .

De door U genoemde punten zijn grotendeels in de bespreking van dit project in de DEC vergadering aan de orde geweest en hebben niet geleid tot vragen omdat deze punten niet van direct belang bleken voor de ethische afweging . Daar moet wel een kanttekening bij gemaakt worden want het niet stellen van vragen over een aantal van de door U genoemde punten heeft ook te maken met het feit dat het hier gaat om lopend onderzoek waarvan de DEC reeds in eerdere projecten kennis had genomen. De onderzoeker heeft dat in haar antwoord aan U , waar ze ook ingaat op een aantal aan de DEC bekende praktische redenen voor de keuzes die gemaakt zijn , ook aangegeven.

Met vriendelijke groet ,

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** maandag 2 november 2015 14:42  
**Aan:** dec-utrecht  
**Onderwerp:** aanhouden beoordelen AVD108002015280

Geachte leden van DEC Utrecht,

Op 13 oktober hebben wij een aanvraag tot projectvergunning ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project AVD108002015282 getiteld: Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint disease.

Wij willen de onderzoeker om toelichting vragen over een aantal onduidelijkheden. Daarnaast onderbouwt de onderzoeker een aantal keuzes met argumentatie waarvoor geen wetenschappelijke onderbouwing is. Wij willen de onderzoeker vragen om nadere wetenschappelijke onderbouwing voor deze argumentatie.

Graag horen we ook de visie van de DEC hoe in het adviseringstraject hier tegenaan is gekeken. En of u dit in uw discussie heeft betrokken.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

.....

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

.....

T: 0900 2800028

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



**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Tav. Instantie voor Dierenwelzijn  
Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015282

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum: **25 NOV. 2015**  
Betreft: Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases" met aanvraagnummer AVD108002015282. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

U heeft uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD op 13 november 2015. In een brief heeft u de vragen beantwoord en de bijlagen dierproeven heeft u op 13 november 2015 aangepast en opnieuw ingediend.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Deze voorwaarden zijn algemene voorwaarden die de CCD stelt bij meerjarige projecten om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10 van de wet.

U kunt met uw project "Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2015 tot en met 30 augustus 2020. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 12 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij hebben de DEC om nadere toelichting gevraagd en hebben op 10 november 2015 antwoord van de DEC ontvangen. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aangevuld met de bovengenoemde algemene voorwaarden. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.



**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

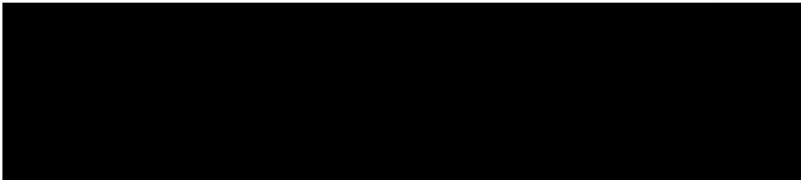
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: postbus 12007

Postcode en woonplaats: 3501AA Utrecht

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 december 2015 tot en met 30 augustus 2020, voor het project "Local controlled release of medication for the treatment of degenerative joint diseases" met aanvraagnummer AVD108002015282, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 13 oktober 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 13 oktober 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 12 oktober 2015, ontvangen op 13 oktober 2015.
  - d. De aanvullingen: aangepaste bijlagen dierproeven, ontvangen op 13 november 2015

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Rat model for mild osteoarthritis	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	132	Matig/ moderate
Rat model of induced IVD degeneration	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	110	Matig/ moderate
[REDACTED] model for the induction of mild osteoarthritis (goat)	Geiten ( <i>Capra aegagrus hircus</i> )	48	Matig/ moderate
Canine model of IVD degeneration	Honden ( <i>Canis familiaris</i> ) / beagle	28	Matig/ moderate
Degradation of biomaterial and release kinetics	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	86	Matig/ moderate

### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

**Datum**  
25 november 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015282

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

**Datum**  
25 november 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015282

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

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

Uit artikel 13c 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 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.

### **Levensloofdossier**

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.

Inventaris Wob-verzoek W16-10S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015284</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		



20 OKT. 2015

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	Ja > Vul uw deelnemernummer in	10700 / 284
		Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	50169181
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	[Redacted]
		Postbus	Postbus 616
		Postcode en plaats	[Redacted] Maastricht
		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
		(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] Dhr.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] Dhr.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]





1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	Dhr. Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1 1	Wat voor aanvraag doet u?	Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
2.2 2	Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier Nee > Ga verder met vraag 3
2.3 3	Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	Nee > Ga verder met vraag 3 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 10 - 2015
		Einddatum	31 - 08 - 2018
3.2	Wat is de titel van het project?	De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nieuwe inzichten in het ontstaan van levertoxiciteit.	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC-UM
		Postadres	Postbus 616/box 48/6200 MD Maastricht
		E-mailadres	Secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl



## 4 Betaalgegevens

4. Om welk type aanvraag gaat het?	Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00	Lege
1	Wijziging €	Lege
4. Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.		
2	Na ontvangst van de factuur. Graag budgetnummer (30943314N) vermelden op factuur	

*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

5. Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
1	X Projectvoorstel
	X Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[Redacted]	
Functie	[Redacted]	
Plaats	Maastricht	[Redacted]
Datum	08-10-2015	[Redacted]
Handtekening	[Redacted]	





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Dagelijks worden wij blootgesteld aan omgevingsfactoren die genotoxische effecten kunnen veroorzaken (bv industriële uitlaatgassen, pesticide, drugs, tabak). Ons lichaam heeft verschillende mechanismen tot zijn beschikking om de ontstane schade te herstellen zoals verschillende DNA reparatie mechanismen en antioxidant reacties (Iyama, T, 2009; Keum, Y.-S., 2012). Het onsuccesvol herstel van schade kan bijdragen aan een toxicologische of carcinogene reactie. Dergelijke schade herstel mechanismen zijn in grote mate afhankelijk van veranderingen in genexpressie op RNA niveau. Wij en andere hebben deze veranderingen (de transcriptoom) in kaart gebracht na de blootstelling aan een groot panel van (geno)toxische stoffen in verschillende cel types. Deze kennis heeft het mogelijk gemaakt dat wij (geno)toxische stress op basis van genexpressie kunnen classificeren en voorspellen. Voor een succesvol schade herstel is een verandering op RNA niveau alleen vaak niet voldoende. Het RNA zal moeten worden omgezet in eiwit voordat er een fenotypische verandering optreedt en er herstel kan plaatsvinden. Dit proces, genaamd mRNA translatie, is een zeer dynamisch proces dat tijdens een stressreactie snel kan veranderen. Tot op heden is dit aspect van regulatie na genotoxische stress nagenoeg niet onderzocht. Dit is opvallend omdat het belang van dit mechanisme bij andere types van stress zoals hypoxie, bestraling en oncogene activatie zeer duidelijk is aangetoond (Leprivier, Rotblat, Khan, Jan, & Sorensen, 2015; Föhling, 2009). Wij voorzien dat het bestuderen van mRNA translatie tijdens genotoxische blootstelling zal leiden tot een verbeterd en completer beeld van de reactie die volgt op genotoxische stress.

De regulatie van mRNA translatie vindt voornamelijk plaats tijdens de initiatie stap van dit proces. Er zijn twee signaleringsroutes die de translatie van mRNA reguleren. De 'mammalian Target of Rapamycin complex 1' (mTORC1) pathway stimuleert mRNA translatie en eiwit synthese doormiddel van de fosforylatie van 'eukaryotic initiation factor 4<sup>E</sup> binding protein' (4E-BP1), S6 kinase 1 (S6K) en 'eukaryotic elongatie factor 2 kinase' (EEF2K). Verschillende stress signalen remmen de activiteit mTORC1 en dit heeft een grote invloed op de getranslateerde mRNAs (Ma & Blenis, 2009). Translatie wordt ook gereguleerd door de 'unfolded protein response' (UPR), activatie van deze response leidt tot een globale remming van mRNA translatie zodat de opeenstapeling van onvolledig of foutief gevouwen eiwitten stopt. Tegelijkertijd wordt de translatie van genen die belangrijk zijn voor de stressreactie zoals ATF4 juist gestimuleerd (Walter & Ron, 2011). Tijdens dit project willen wij voor ieder gen in ons lichaam meten hoe goed dit wordt omgezet in eiwit. Met andere woorden willen we meten hoe efficiënt mRNA translatie verloopt voor ieder gen en hoe dit verandert tijdens genotoxische stress. Tevens willen wij bepalen welke groepen van genen gereguleerd worden door de mTORC1 signaaltransductie route en welke door de UPR.

Op dit moment zijn toxicologische studies afhankelijk van dierexperimenten. De 'rodent bioassay' wordt gezien als de gouden standaard voor het bepalen van de toxiciteit van nieuwe stoffen. Om carcinogeniteit vast te stellen worden muizen of ratten gedurende 2 jaar dagelijks blootgesteld aan een zeer hoge dosis van een desbetreffende stof. Deze dierproeven kunnen verminderd en in de toekomst vervangen worden. Daarvoor willen wij *in vitro* laboratorium assay ontwikkelingen voor het bepalen van de toxicologische uitkomst (Kleinjans, 2014). Om de transitie naar *in vitro* modellen mogelijk te maken is het cruciaal dat wij een gedetailleerd en compleet overzicht hebben van de mechanismen die ten grondslag liggen aan deze *in vitro* testen. Hiervoor is verder mechanistisch onderzoek noodzakelijk. Met deze studie willen wij meer inzicht verkrijgen in het belang van mRNA translatie tijdens genotoxische stress.



Daarnaast kunnen wij aan de hand van deze datasets nieuwe biomarkers ontdekken die gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van nieuwe *in vitro* toxiciteitstesten. Voor dit onderzoek gaan wij primaire muis hepatocyten gebruiken die geïsoleerd worden van de muis doormiddel van een twee stap collagenase perfusie. Wij hebben heeft veel ervaring met deze techniek (Mathijs, Brauers, et al., 2009; Mathijs, Kienhuis, et al., 2009; Van den Hof et al., 2014).

#### Referenties

- Fähling, M. (2009). Surviving hypoxia by modulation of mRNA translation rate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9a), 2770-2779. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00875.x
- Iyama, T, Wilson III, D. M., (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, *DNA Repair*, 12(8), August 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>.
- Keum, Y.-S. (2012). Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes. *Biomolecules & Therapeutics*, 20(2), 144–151. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.2.144
- Kleinjans, J. (2014). Chapter 1.1 - Introduction to Toxicogenomics-Based Cellular Models. In J. Kleinjans (Ed.), *Toxicogenomics-Based Cellular Models* (pp. 3-11). San Diego: Academic Press.
- Leprivier, G., Rotblat, B., Khan, D., Jan, E., & Sorensen, P. H. (2015). Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 845-860. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.002
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 307-318. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2672>
- Mathijs, K., Brauers, K. J. J., Jennen, D. G. J., Boorsma, A., van Herwijnen, M. H. M., Gottschalk, R. W. H., . . . van Delft, J. H. M. (2009). Discrimination for Genotoxic and Nongenotoxic Carcinogens by Gene Expression Profiling in Primary Mouse Hepatocytes Improves with Exposure Time. *Toxicological Sciences*, 112(2), 374-384. doi:10.1093/toxsci/kfp229
- Mathijs, K., Kienhuis, A. S., Brauers, K. J. J., Jennen, D. G. J., Lahoz, A., Kleinjans, J. C. S., & van Delft, J. H. M. (2009). Assessing the Metabolic Competence of Sandwich-Cultured Mouse Primary Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(6), 1305-1311. doi:10.1124/dmd.108.025775
- Van den Hof, W. F. P. M., Coonen, M. L. J., van Herwijnen, M., Brauers, K., Wodzig, W. K. W. H., van Delft, J. H. M., & Kleinjans, J. C. S. (2014). Classification of Hepatotoxicants Using HepG2 Cells: A Proof of Principle Study. *Chemical Research in Toxicology*, 27(3), 433-442. doi:10.1021/tx4004165
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086. doi:10.1126/science.1209038

---

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is het bepalen van de impact van genotoxische stress op de regulatie van mRNA translatie doormiddel van het gebruik van primaire muis hepatocyten.

De doelstelling van deze studie zijn:

1. Het genereren van een totaal RNA expressie profielen met behulp van 'RNA sequencing' (RNAseq) van de primaire muis hepatocyten na de blootstelling van genotoxische stoffen.
2. Het genereren van polysomaal RNA expressie profielen net als in 1.
3. Het berekenen van translatie-efficiëntie tijdens genotoxische stress van alle genen met behulp van RNAseq data van 1 en 2
4. Identificeren en valideren van nieuwe biomarkers die gerelateerd zijn aan de genotoxische stress.
5. Bepalen van de rol van de pathways die mRNA translatie reguleren tijdens genotoxische stress.

Onze hypothese is dat de mogelijkheid om mRNA translatie te reguleren van belang is voor een cel om tijdens genotoxische stress adequaat te reageren en zodoende opgedane schade te minimaliseren en herstellen. Om deze hypothese te testen gaan wij primaire muis hepatocyten blootstellen aan verschillende genotoxische stoffen om vervolgens m.b.v. RNAseq te bepalen welke mRNAs verschillend tot expressie komen en welke mRNAs verschillend getransleerd worden. Om dit mogelijk te maken scheiden wij eerst alle mRNAs op basis van de mate waarin ieder mRNA getransleerd wordt m.b.v. sucrose gradiënten. Dit levert ons verschillende fracties van mRNA op, variërend van niet getransleerd tot zeer goed getransleerd. Deze fracties zullen wij vervolgens analyseren m.b.v. RNAseq. Dit stelt ons in staat om te bepalen met welke snelheid een mRNA wordt omgezet in eiwit tijdens controle condities en tijdens genotoxische stress. Deze data zal ons nieuwe inzichten geven in transcriptionele en translationele veranderingen die plaatsvinden tijdens genotoxische blootstellingen. Verder kunnen we deze data gebruiken om andere datasets (transcriptoom en proteoom) met elkaar te koppelen in inzichtelijke patronen om zo de mechanismen die ten grondslag liggen aan de genotoxische reactie beter in kaart te kunnen brengen.

### 3.3 Belang

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

Verbeterd inzicht in de mechanismen die leiden tot toxiciteit is cruciaal voor het ontwikkelen van *in vitro* toxiciteit testen. Deze *in vitro* testen zijn hoog noodzakelijk om een goed alternatief te bieden voor de standaard dier testen die gebruikt worden voor toxiciteitstesten. Om tot nieuwe inzichten te komen hebben in het verleden verschillende studies plaatsgevonden die erop gericht waren om veranderingen in totaal RNA expressie en/of eiwit expressie te meten. Beide benaderingen hebben hun eigen beperkingen met als gevolg dat het integreren en vervolgens begrijpen van deze twee datasets lastig kan zijn. Door het bestuderen van mRNA translatie willen wij de integratie van totaal RNA en eiwit expressie verbeteren. Met deze verbeterde inzichten kunnen wij belangrijke mechanismen identificeren die de oorzaak zijn van het ontstaan en het aanhouden van genotoxische stress. Tevens zal deze nieuwe kennis kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe *in vitro* genotoxische testen.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

#### Fase 1

Het onderzoeken of de blootstelling van benzo(a)pyrene leidt tot verandering van de mRNA translatie in muis hepatocyten. Gen expressie wordt gemeten van totaal RNA monsters en polysome fracties. Wanneer de translatie van genen na de behandeling van benzo(a)pyrene verandert ten opzicht van de controle monsters en als gen expressie van de verschillende biologische replica's van de polysome assay vergelijkbaar zijn met de totale RNA expressie gaan we verder met het project. Dit is het eerste 'go, no go' punt.

#### Fase 2

Het valideren van de data uit fase 1. Deze validatie bestaat uit het meten van de getransleerde genen d.m.v. qPCR en eiwit expressie van nieuw gesynthetiseerde eiwitten d.m.v. Western blotting. Hiervoor zijn nieuwe muis hepatocyten nodig omdat al het polysomaal RNA van fase 1 gebruikt wordt voor RNAseq en er nog geen eiwitmonsters zijn. Wanneer er een correlatie is met de data van fase 1 gaan we verder met het project. Dit is het tweede 'go, no go' punt.

#### Fase 3

Deze fase komt overeen met fase 1 en 2 alleen het experiment wordt uitgebreid met 4 andere genotoxische stoffen en meerdere tijdspunten.

#### Fase 4

Tijdens deze fase wordt het belang van de regulatoire mechanismen (mTOR en UPR) van translatie tijdens genotoxische stress bepaald. Doormiddel van het analyseren van de genexpressie (fase 1&3) en het uitschakelen van de mechanismen door middel van shRNA lentivirale infecties.

Wij hebben al veel ervaring met het isoleren en kweken van primaire muis hepatocyten dat wij geen problemen verwachten.

---

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

Dit project bestaat uit vier delen, voor elk deel is de isolatie van muis hepatocyten nodig.

1. RNAseq van polysome fracties
2. Validatie of RNAseq resultaten
3. Uitbreiden van 1+2 met andere genotoxins en tijd punten
4. De rol van mTORC1 en UPR bepalen tijdens genotoxische stress

---

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

Fase 1: In deze fase onderzoeken wij of de translatie van mRNA verandert na de blootstelling van een genotoxine en hoe robuust de combinatie van de polysome assay en RNAseq is. In deze fase is het belangrijk dat wij een verandering van de translatie van mRNA kunnen detecteren en kunnen koppelen aan biologische mechanismen. Wanneer wij dit kunnen aantonen gaan wij naar fase 2.

Fase 2: Het valideren van de gevonden resultaten van fase 1 is een belangrijk onderdeel van het onderzoek om de betrouwbaarheid van de RNAseq data vast te stellen. Wanneer RNAseq data overeen komt met de validatie experimenten gaan wij verder met onderzoek.

Fase 3: Wij verwachten dat genotoxische stress via verschillende mechanismen kan worden aangezet daardoor is het belangrijk dat wij onze experimenten uitbreiden met meerdere genotoxins. Zodat wij zo veel mogelijk verschillende biologische pathways kunnen identificeren die belangrijk zijn voor de ontwikkeling en het aanhouden van genotoxische stress.

Fase 4: mTORC1 en UPR zijn de belangrijkste mechanismen die translatie reguleren. Hier gaan we met eenzelfde aanpak RNAseq data genereren na het uitschakelen van mTORC1 en UPR signalering. Hiermee kunnen wij genen identificeren die door beide signaaltransductie routes gereguleerd worden en bepalen wat hun belang is tijdens genotoxische stress.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Hepatocyten isolatie
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
			Hepatocyten isolatie

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Regulatie van mRNA translatie is een belangrijk mechanisme dat de cel in staat stelt om snel te reageren op stressvolle condities. Onderzoek heeft uitgewezen dat dit belangrijk is tijdens zuurstof tekort, bestraling en oncogen activatie. Er is echter nagenoeg niets bekend over het belang van mRNA translatie tijdens de response voor genotoxische blootstellingen. Met dit onderzoek willen wij genen ontdekken waarvan de mRNA translatie veranderd in reactie op genotoxines.

Dit toxicologisch onderzoek focust zich op de lever aangezien dit de belangrijkste plaats in het lichaam is waar biotransformatie en detoxificatie van lichaamsvreemde elementen plaatsvind. In dit onderzoek zullen we vers geïsoleerde primaire muizen hepatocyten verder kweken in collageen sandwich culturen in ons laboratorium. Na blootstelling aan genotoxische stoffen zullen totaal RNA en polysomaal RNA (effectief getransleerd RNA) geïsoleerd worden. Vervolgens bepalen we doormiddel van RNAseq de expressie profielen van beide RNA fracties. Aan de hand van deze data berekenen we vervolgens de translatie efficiëntie. Voor de validatie experimenten zal naast RNA en polysomaal RNA ook totaal eiwit geïsoleerd worden. De eiwit samples worden in ons

laboratorium geanalyseerd worden doormiddel van Western blotting voor de kandidaat genen.

Deze studies zullen leiden tot:

1. Expressieprofielen van totaal RNA met behulp van RNAseq voor alle genen in muizen hepatocyten onder controle condities en na blootstelling aan genotoxische stoffen.
2. Expressieprofielen van getransleerd (polysomaal) RNA met behulp van RNAseq voor alle genen in muizen hepatocyten als in 1.
3. Translatie efficiëntie waardes voor alle genen bepaald aan de hand van dataset verkregen in 1 en 2 in muizen hepatocyten als in 1 en 2.
4. Validatie van top kandidaten op RNA en eiwit niveau.
5. Inzichten in de pathways die mRNA translatie beïnvloeden tijdens genotoxische stress.

Kandidaat genen die we in deze studie identificeren dienen als potentiële biomarkers die gebruikt kunnen worden voor het ontwikkelen van nieuwe in vitro testen voor het bepalen van genotoxiciteit en carcinogeniteit. Het ultieme doel is een bijdrage te leveren aan het verminderen van het aantal proefdier studies voor het bepalen van carcinogeniteit.

---

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

De muis wordt onder anesthesie gebracht om vervolgens hepatocyten te isoleren doormiddel van een twee-stap collagenase perfusie. Deze procedure met de muis duurt ongeveer 1 uur en eindigt met het euthanaseren van de muis.

---

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

Met behulp van een power berekening hebben wij aangetoond hoeveel biologische replica's van de primaire hepatocyten culture wij nodig hebben. Omdat wij geen verschillende muizen groepen hebben maar RNAseq samples van de primaire muis hepatocyten wordt statistiek toegepast voor deze samples. RNAseq is een procedure met veel verschillende stappen waardoor deze techniek veel verschillende variabelen heeft zoals de kwaliteit van de library en het aantal reads per sample. Door het gebruik van gefokt dieren van hetzelfde geslacht is de biologische variaties tussen de samples het laagst en zijn er uiteindelijk minder dieren nodig. Voor de power berekening van RNAseq samples hebben wij de Package RNASeqPower versie 1.9.0 gebruikt (Therneau T, Hart S and Kocher J).

Referentie power berekening: Therneau T, Hart S and Kocher J. Calculating samples size estimates for RNA Seq studies. R package version

---

## B. De dieren

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

Voor onze experimenten gebruiken wij mannelijke C57BL/6 muizen met een herkomst van een geregistreerd fok bedrijf. Hierbij zullen wij zoveel mogelijk gebruik maken van surplus dieren. De C57BL/6 muizen worden standaard gebruikt voor farmacologische en toxicologische onderzoeken. Wij hebben in het verleden een grote hoeveelheid data gegenereerd met hepatocyten van mannelijke muizen van deze soort. De huidige studie is erop toegespitst om naast het verschaffen van nieuwe data ook de oude datasets te verrijken. Het is dus cruciaal dat we deze experimenten met precies dezelfde muizen (mannelijke C57BL/6) en condities uitvoeren. Daarnaast willen wij zo min mogelijk variatie introduceren in onze experimenten door met één geslacht te werken, de mannelijke muizen. Hoe lager de variatie des te minder muizen we nodig hebben. Het aantal muizen dat we nodig hebben hangt af van het aantal geïsoleerde levende hepatocyten per lever. Voor de polysome assay gaan wij 5 miljoen hepatocyten per monster gebruiken (dit is inclusief totaal RNA fractie voor RNA seq). Uit onze eigen studies hebben wij berekend dat wij per lever 2,5 culturen kunnen starten. Voor ieder genotoxine behandelen wij de cellen op twee tijdstippen en met twee concentraties. Dit resulteert in 5 culturen per genotoxine (inclusief onbehandelde controles). In totaal gaan wij 5 genotoxins testen

en hebben wij deze cultures 9x nodig (biologische replica's voor het sequensen (5x), validatie (2x), en mTORC1 en UPR studies (2x)). Wij verwachten dat er 10% extra cultures nodig zijn voor eventuele uitval en door de opbrengst van levende hepatocyten per lever varieert. In totaal zijn er 250 cultures nodig en dit zijn 100 muizen.

#### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Voor de vervanging van het dieren experiment hebben we overwogen om humane hepatocyten te isoleren. Echter is het niet ethisch verantwoord om leverweefsel van gezonde vrijwilligers te vragen. Het verkrijgen van humaan leverweefsel via het ziekenhuis kan sporadisch. Het grote probleem met deze leverweefsels is echter dat ze afkomstig zijn van patiënten met leveraandoeningen zoals leverkanker of steatose. Vaak zijn deze weefsels al blootgesteld zijn aan medicijnen zoals chemotherapie. Voor ons onderzoek is het echter zeer belangrijk om 'gezonde' hepatocyten te gebruiken waardoor deze potentiële bron van hepatocyten afvalt. Van kanker cellijnen of geïmmortaliseerde levercellijnen komt het fenotype niet meer overeen met primaire hepatocyten en hebben een verlaagde expressie van de metabolische fase I en II enzymen. Deze enzymen zijn nodig voor het omzetten van stoffen en zijn dus cruciaal voor het bestuderen van toxiciteit (Soldatow et al., 2013; Gerets et al., 2012). Omdat de hepatocyten snel dood gaan tijdens zuurstof tekort is het niet mogelijk om levende hepatocyten te isoleren van dode dieren. Voor het onderzoek zijn levende hepatocyten nodig waardoor wij geen slachthuis materiaal kunnen gebruiken.

In het kader van vermindering zullen wij onze blootstellingen in vitro uitvoeren i.p.v. in vivo. Dit betekent dat we 2,5 blootstellingen kunnen uitvoeren per muis i.p.v. één. Verder kunnen we het aantal muizen verminderen door de biologische variatie zo laag mogelijk te houden. We weten van analyses uit het verleden dat het gebruik van alleen het mannelijke geslacht een sterk verminderde variatie optreedt dan wanneer mannetjes en vrouwtje gebruikt worden. Bovendien wordt er gebruik gemaakt van historische controles. Als er binnen het fokprogramma van de universiteit een surplus aan mannelijke C57BL/6 muizen is zullen wij deze muizen eerst gebruiken.

Voor de verfijning van het experiment worden de dieren in slaap gebracht. Verder worden de dieren zelf niet aan genotoxische stoffen blootgesteld. Het potentieel ongerief veroorzaakt door de blootstelling wordt vermeden.



#### Referenties

Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Atienzar, F. A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*, 28(2), 69–87. <http://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>

Soldatow, V. Y., LeCluyse, E. L., Griffith, L. G., & Rusyn, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology Research*, 2(1), 23–39. <http://doi.org/10.1039/C2TX20051A>

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

Doordat de muizen onrustig worden door het transport naar een ander laboratorium worden de dieren onder anesthesie gebracht en de hepatocyten geïsoleerd op het dierenlaboratorium.

### Herhaling en duplicering

#### E. Herhaling

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

Het bestuderen van de effecten van genotoxische stoffen op mRNA translatie in hepatocyten is nog niet eerder uitgevoerd. Dit zijn wij op 2 manieren nagegaan. 1. Grondige zoekacties op pubmed omtrend dit onderwerp leveren geen studies op waarbij het effect van genotoxische stoffen op mRNA translatie is gemeten. 2. Binnen ons uitgebreid netwerk van nationale en internationale collaborators heeft niemand een dergelijke studie uitgevoerd.

### Huisvesting en verzorging

#### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal

Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Omdat wij voor deze studie alleen de hepatocyten nodig hebben en dat voor de isolatie van de cellen de lever wordt verwijderd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# DEC-advies

## Projectvoorstel 2015-007-25-09-2015

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-007
2. Titel van het project: *De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten.*
3. Titel van de NTS: *Nieuwe inzichten in het ontstaan van levertoxiciteit.*
4. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC/ DEC-UM
  - telefoonnummer contactpersoon/ [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon:  
[REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - X ontvangen door DEC/ 18-9-2015
  - X aanvraag compleet/ 02-10-2015
  - X in vergadering besproken 25-09-2015
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking van 29-09-2015 tot 02-10-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
- Datum dd. 29-09-2015
  - Strekking van de vragen:
    - De DEC-UM vraagt zich af of het niet mogelijk is om slachthuismateriaal te gebruiken of surplus dieren?
    - Hoe wordt de dood tot stand gebracht?
  - Datum antwoord 02-10-2015
  - Strekking van het (de) antwoord(en); *De vragen zijn naar tevredenheid van de DEC-UM beantwoord.*
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag; JA
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) JA
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren JA
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering NVT

## C. Beoordeling (inhoud):

### 1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord
- wettelijk vereist

### 2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) JA

### 3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Het belang van de doelstelling wordt door de DEC-UM erkend, te weten: *men bestudeert mechanismen die leiden tot toxische schade, genotoxische stress, en mechanismen die de ontstane schade teniet trachten te doen. Beter inzicht in deze processen kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe in vitro genotoxische testen.*

### 4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project JA, te weten: *Naar de overtuiging van de DEC-UM beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

### 5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd

- Bedreigde diersoort (en) (10.e.4)
- Niet-menselijke primaten (10.e)
- Dieren in/uit het wild (10.f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10.h)
- Hergebruik (1.e.2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)
- Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode (13.c.3)

### 6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het betreft een terminaal experiment.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen: Nee
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. JA
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. JA
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd: JA

## D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren (niet), de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt (niet) gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project (geen) voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

### D. Ethische afweging

De DEC-UM stelt enerzijds vast dat het project "De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten niet zonder dierproeven kan worden uitgevoerd". Het voorstel behelst het gebruik van mannelijke muizen in een terminale proef. Anderzijds onderschrijft de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier.

De DEC-UM acht de doelstelling van dit fundamentele onderzoek van substantieel belang. In het betreffende project bestudeert men mechanismen die leiden tot toxische schade, genotoxische stress, en mechanismen die de ontstane schade teniet trachten te doen. Beter inzicht in deze processen kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe in vitro genotoxische testen. Dit zal bijdragen aan de vermindering en vervanging van dierexperimenten in de toxicologie. Dit is van belang voor proefdieren en in het licht van het algemene streven naar het vervangen van dierproeven door alternatieve, diervriendelijke wetenschappelijke onderzoeksmethoden.

De opzet van het onderzoek sluit aan bij de doelstelling en is voldoende innovatief.

De aanvrager heeft de benodigde wetenschappelijke kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

De gewenste uitkomsten lijken relevant en haalbaar.



In de gekozen strategie, technieken en diermodel wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef zou kunnen worden vermeden. De DEC-UM onderschrijft de keuze voor uitsluitend mannelijke C57BL/6 muizen, waardoor de gegenereerde data ook met historische data vergeleken kunnen worden en de vermindering van aantallen wordt gediend.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM in haar ethische afweging het belang van de voorgestelde dierproeven in het project "De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten", van zwaarder gewicht dan de voorziene schade (terminaal ongerief en dood) voor de maximaal 100 betrokken dieren.

De DEC-UM beschouwt de voorgestelde dierproeven derhalve als ethisch gerechtvaardigd en voorziet het project "De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten van een positief advies".

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - o De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is
  - o De volgende doorslaggevende ethische bezwaren
  - o De volgende tekortkomingen in de aanvraag
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - o 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.
  - o Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist
  - o Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen

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

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-UM tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar is.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

[Redacted]

Postbus Postbus 616

6200bMD MAASTRICHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD107002015284

**Bijlagen**

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002015284. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 oktober 2015  
Geplande einddatum: 31 augustus 2018  
Titel project: De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten.  
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe inzichten in het ontstaan van levertoxiciteit  
Naam DEC: DEC-UM  
Postadres DEC: Postbus 616/box 48/6200 MD Maastricht  
E-mailadres DEC: Secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED] UM

Plaats:

Maastricht

Datum:

8 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus Postbus 616

6200bMD MAASTRICHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD107002015284

**Bijlagen**

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 19 oktober 2015

Vervaldatum: 18 november 2015

Factuurnummer: 15700284

Ordernummer: 30943314N

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002015284	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616  
6200 MD Maastricht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
AVD107002015284

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 25 november 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten' met aanvraagnummer AVD107002015284. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project 'De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten' starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 november 2015 tot en met 31 augustus 2018.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM meegestuurd. De DEC heeft uw aanvraag besproken in haar vergadering van 25 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Op onderstaande punten wijken wij af van het DEC advies.

1) U heeft in uw aanvraag aangegeven alleen mannelijke dieren te willen gebruiken voor dit project. Uw overwegingen voor het alleen gebruik van mannelijke dieren heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. U heeft aangegeven dat u in het verleden een grote hoeveelheid data gegenereerd heeft met hepatocyten van mannelijke muizen. Aangezien de huidige studie erop is gericht om naast het verschaffen van nieuwe data ook de oude datasets te verrijken, is het volgens u cruciaal dat deze experimenten met precies dezelfde muizen en onder dezelfde condities uitgevoerd worden. U heeft aangegeven dat uit analyses in het verleden is gebleken dat door het gebruik van alleen het mannelijke geslacht een sterk verminderde variatie optreedt in vergelijking met het gebruik van zowel mannetjes als vrouwtjes. U stelt bovendien, in antwoord op een vraag van de DEC, daar waar mogelijk gebruik te maken van surplus dieren binnen het fokprogramma binnen de universiteit.

Wij hebben er geen bezwaar tegen dat u alleen mannelijke dieren gebruikt voor dit project indien u inderdaad gebruik zult maken van surplus dieren. Om dit te borgen, en om het aantal in

voorraad gedode dieren te beperken, hebben wij een aanvullende voorwaarde toegevoegd aan de vergunning.

2) In uw aanvraag geeft u aan uit welke fases uw onderzoek bestaat. Hoewel u in uw aanvraag verschillende keuzemomenten beschrijft, zijn wij van mening dat de criteria op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek te continueren en met een volgende fase te starten niet in voldoende mate zijn beschreven. U dient daarom deze criteria voor aanvang van het project af te stemmen met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

In aanvulling op het DEC advies hebben wij een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

Wij nemen voor het overige het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

#### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

**Datum**  
25 november 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD107002015284

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Universiteit Maastricht  
Postbus: Postbus 616  
Postcode en woonplaats: 6200 MD Maastricht  
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 november 2015 tot en met 31 augustus 2018, voor het project 'De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten' met aanvraagnummer AVD107002015284, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat de CCD van mening is dat de criteria op basis waarvan besloten wordt het onderzoek te continueren en te starten met een nieuwe fase niet voldoende zijn beschreven. Daarnaast heeft de CCD een voorwaarde opgenomen waarmee het gebruik van surplus dieren geborgd wordt. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Hepatocyten isolatie	Muizen (C57BL/6)	100	Terminaal

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

- 1) Het gebruik van alleen mannelijke dieren voor dit project wordt toegestaan op voorwaarde dat gebruik wordt gemaakt van surplus dieren.
- 2) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele keuzemomenten, inclusief de criteria op basis waarvan wordt besloten het onderzoek te continueren en te starten met een volgende fase, voor aanvang van het project ter goedkeuring worden voorgelegd aan de IvD.

### Algemene voorwaarde

1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd

**Datum**

25 november 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD107002015284

van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

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

**Datum**

25 november 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD107002015284

Uit artikel 13c 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 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.

Inventaris Wob-verzoek W16-10S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015285</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x			x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	
14	Mail terugkoppeling DEC 17-12-2015				x		x	x	





22 OKT. 2015

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in | 10800 *1285*  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4

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

Straat en huisnummer	Instzntie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus	12007
Postcode en plaats	3501AA Utrecht
IBAN	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) 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]	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 9 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum  | 3 0 _ 0 8 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Regeneratieve behandelingen voor chronische rugpijn
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € 468,00 Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Project Proposal [REDACTED] UU\_2015\_Appendix

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]  
 Functie [REDACTED]  
 Plaats [REDACTED]  
 Datum 18-10-2015  
 Handtekening [REDACTED]





## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

The project focuses on developing treatment strategies for neck and back pain of canine and human patients in close collaboration with academia from the medical and bioengineering field.

Low back pain in humans has been identified as one out of seven high-burden conditions by the 2013 Report *Priority Medicines for Europe and the World*. (Kaplan *et al.*, 2013) It is the most common type of pain restricting daily activity in EU citizens" (Eurobarometer, 2007) and entails the largest number of years lived with disability. (Hoy *et al.*, 2014) Neck and back pain are strongly related to intervertebral disc (IVD) degeneration (Cheung *et al.*, 2009). Like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration with similar characteristics and clinical signs (Meij and Bergknut, 2010a). Owners of dogs may report unilateral or bilateral lameness or paresis/paralysis, toe dragging, low tail or neck carriage, difficulties with rising, sitting or lying down, reluctance to jump or climb, urinary or faecal incontinence, and hyperesthesia or self-mutilation (Meij and Bergknut, 2010b). In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs (Bergknut *et al.*, 2012a). Given that, not only on a clinical levels, but also on a histological, biochemical, and radiological level IVD degeneration in canines is similar to human, the dog is considered to be a suitable animal model for human IVD degeneration (Bergknut *et al.*, 2012b). As such, this project employs experimental dogs as a last step to translate new treatment strategies towards canine and human patients with IVD disease.

The healthy IVD provides flexibility to the spine and consists of a gelatinous nucleus pulposus (NP) and fibrous annulus fibrosus (AF). During IVD degeneration, the glycosaminoglycan (GAG) and water content of the NP decreases. Because of the changed IVD matrix, diffusion of nutrients becomes impaired, which further deteriorates the health of the IVD cells and healthy matrix synthesis. Since the avascular IVD exhibits inadequate matrix repair, a vicious circle develops in which the IVD weakens and experiences increased vulnerability to damage by physiologic loading (Bergknut *et al.*, 2013, Colombini *et al.*, 2008). Besides, typical large, vacuolated notochordal cells (NCs) are replaced by smaller, non-vacuolated chondrocyte like cells (CLCs) in the NP during early IVD degeneration (Bergknut *et al.*, 2013).

Current treatment for back and neck pain in both humans and dogs is mostly palliative and consists generally of pain relief by oral administration of analgesics and anti-inflammatory drugs, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Patients with late stage disease and refractory to pain medication can only be treated surgically. Both in dogs and humans, this is primarily done by arthroplasty or by removing the IVD and fusing the two vertebrae by means of bone regeneration (Freemont *et al.*, 2002, Smolders *et al.*, 2012). These surgical treatment strategies demand long term recovery, do not lead to full recovery, and do not support a biological and hence functional repair of the diseased joint. Therefore, there is substantial interest in new regenerative therapies that repair the degenerated IVD and restore its function (Bach *et al.*, 2014c, Li *et al.*, 2015, Sakai and Andersson, 2015). These treatment strategies address the disease at earlier stages in order to prevent the need for heavy demanding surgery.

Besides genetic predisposition, several factors can be the initiators of IVD degeneration, including ageing, abnormal biomechanical loading, and impaired

nutrition. Regardless of the initiating factor, IVD degeneration is mediated by inflammatory processes (Molinos *et al.*, 2015). Given that we cannot address the primary cause of IVD degeneration in all cases, treatment strategies concentrate on effective pain management and treatment at an earlier stage to prevent heavy demanding surgery. The project aims at controlling inflammation and by providing anabolic stimuli to restore the IVD homeostasis and achieve regeneration. This project encompasses two arms: a basic and a translational one. In the basic research arm, we identify potential new bioactive substances to be implemented in treatment strategies by mimicking developmental biology. The promising bioactive substances are further developed and validated by means of in vitro studies and the use of small animal models (mice and rats) before they are being further translated into a large animal model. In the translational research arm, potent anti-inflammatory and regenerative bioactive substances for the treatment of IVD degeneration are being evaluated for their efficacy in a large animal model (dog).

Thus far, there have been at least two bioactive substances identified: caveolin-1 and Link-N either or not in combination with the intradiscal transplantation of mesenchymal stem cells. These two substances will be addressed over the course of this proposal.

**Caveolin-1:** The membrane protein caveolin-1 may be regarded an exciting target for developing strategies for IVD regeneration. Advantageous effects of caveolin-1 have been demonstrated in several tissue types (Baker and Tuan, 2013, Haines *et al.*, 2011, Head *et al.*, 2011, Tourkina *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2011). It is essential for the structural integrity and function of caveolae (flask-shaped invaginations of the plasma membrane) of many differentiated cell types (Baker and Tuan, 2013, Dai *et al.*, 2006, Heathfield *et al.*, 2008, Mercier *et al.*, 2009, Okamoto *et al.*, 1998, Zou *et al.*, 2011) and is involved in endocytosis, the formation and transport of caveolae, cell adhesion and migration (Hulit *et al.*, 2000). Moreover, caveolin-1 is implicated in cell cycle regulation, senescence and apoptosis (Gvaramia *et al.*, 2013). In addition, as a scaffolding protein, it functionally regulates signal transduction of various signaling pathways (Okamoto *et al.*, 1998, Zou *et al.*, 2011). We have already shown that early canine IVD degeneration involves a down-regulation of caveolin-1 expression and that caveolin-1 is needed for the maintenance of a healthy NP phenotype in mice (Smolders *et al.*, 2013b). This project aims to further elucidate the role of caveolin-1 in IVD degeneration and regeneration. If proven to be promising, in vivo studies will be conducted in small animal models for safety and dose finding ( rat IVD model) prior translation to a large animal model (dog)

**Link-N:** Link N (a 16 amino acid peptide) is a proteolytic fragment of link protein, an important cross-linker and stabilizer of the major structural components of cartilage: aggrecan and hyaluronan. Link N exerts its anabolic effects on human and bovine CLCs (Abbott *et al.*, 2013, Mwale *et al.*, 2003) and intact human IVDs *ex vivo* (Gawri *et al.*, 2013) via signaling through the BMP type II receptor (Wang *et al.*, 2013). A single Link-N injection in a (annular needle punctured) degenerated rabbit IVD stimulated aggrecan and down-regulated metalloproteinase expression. In addition, the IVD proteoglycan content tended to increase and disc height improved after 12 weeks (Mwale *et al.*, 2011). Being a synthetic peptide, Link-N has considerable financial benefits for clinical use over recombinant growth factors, because it is extremely cheap to produce. We have recently shown *in vitro* that only AF cells, and not CLCs, have the ability to proteolytically process the Link-N peptide resulting in a fragment spanning amino acid residue 1-8 [REDACTED] (Gawri *et al.*, 2014). The biologically active sequence is preserved within this fragment (Gawri *et al.*, 2014); [REDACTED]

[REDACTED] and more likely to attract investment for clinical trials in canine and human patients because it has recently been filed for a patent ([REDACTED] Patent published).

Note: a reference list has been included in the Appendix of this proposal.

### 3.2 Purpose

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

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

Overall aim: to develop new treatment strategies for disc degeneration by mimicking developmental biology.

Key objectives:

**1. Develop medium to high throughput functional assays to identify the biological potency of identified targets with anti-inflammatory and regenerative properties**, including peptides like caveolin-1 and the N-terminus of Link protein (Link-N), miRNAs, and other bioactive factors emerging from key objective 3. This objective will help determine the exploitation potential of the selected bioactive substances towards regenerative treatment strategies for IVD disease.

*Why is this achievable:* A readily available mouse model is employed (Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrecht). The research group has experience with the cell lines employed, isolation of pure chondrocyte populations and the micro-aggregate culture systems (Bach *et al.*, 2014a, Bach *et al.*, 2015). Primary CLCs from both species are readily available through the Biobank and read out parameters are up and running.

**2. Delineate the role of Caveolin-1 in disc (patho)physiology.**

*Why is this achievable:* The Caveolin-1 KO mice and wild type mice on the same background are readily available at the facilities of the GDL. Preliminary studies have been conducted on the basis of an earlier DEC application (2011.III.12.121) and reveal that *in vivo* knockout of caveolin-1 induces apoptosis, and hence leads to lower NP cell numbers during aging. These results altogether indicate that caveolin-1 is implicated in NC-(patho)physiology.

**3. Identify bioactive targets secreted by notochordal cells that have a regenerative capacity** with the aid of key objective 1 and translate this towards human and canine patients with the aid of small and large animal models.

*Why is this achievable:* We have already demonstrated *in vitro* that conditioned medium from NCs has a regenerative effect regardless of the species employed (NCs from porcine or canine tissue) on human CLCs isolated from degenerated IVDs (Bach *et al.*, 2015). The latter ensures the translational capacity of this objective to the canine and human species, both suffering from IVD disease. Even more so, we have shown that the NC-conditioned medium achieves regenerative effects in NP tissue explants, indicating that this effect is also present in a degenerated NP environment (de Vries *et al.*, 2014).

**4. Translate mesenchymal stem cell (MSC)- and/or growth factor based treatment strategies for disc disease in large animal models.**

*Why is this achievable:* A combinatory treatment of bioactive substance with transplanted MSCs may be a more suitable strategy for treating severely degenerated IVDs. This strategy targets the decreasing cell numbers and the catabolic and inflammatory IVD environment by the transplanted MSCs, while the bioactive substance provides an anabolic stimulus to the resident CLCs and the chondrogenically differentiated MSCs. This strategy is achievable given that (a) multiple studies with experimental animals have been conducted; MSCs transplanted intradiscally demonstrated a regenerative effect and resulted into increased disc height in a meta-analysis (Wang *et al.*, 2015, Yim *et al.*, 2014); (b) one of the first targets to be investigated will be Link-N which has been shown to exert anabolic effects on human degenerated CLCs (Abbott *et al.*, 2013), in intact human IVDs *ex vivo* (Gawri *et al.*, 2013), and *in vivo* in a rabbit annular needle puncture model of IVD degeneration (Mwale *et al.*, 2011).

**5. Demonstrate safety and efficacy of sustained release of the identified bioactive substance by injectable biomaterials loaded with the bioactive substance.**

*Why is this achievable:* from a technological perspective, the research group has gained experience with several biomaterial platforms that effectuate sustained release of the loaded substance, including small molecules and peptides. These studies have been performed in large animal models that are implemented in the current project. Furthermore, we have active collaboration with companies developing these platforms within the context of other ongoing projects. From a biologic perspective, there are several examples in literature showing the additive value of sustained release of growth factors or anti-inflammatory factors over a single injection (Schutgens *et al.*, 2015).

---

### 3.3 Relevance

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

#### Social relevance

*Human aspect:* Although seldom a cause of morbidity, diseases of the musculoskeletal system impose a substantial burden on Western societies that is increasing with ageing of the population (Katz, 2006). Amongst the diseases with most impact is chronic low back pain. Low back pain has been identified as one out of seven high burden conditions by the 2013 Report Priority Medicines for Europe and the World, which identifies key areas of priority research for pharmaceutical innovation to meet public health needs. In a special barometer report exploring health in EU citizens, the most common type of pain restricting daily activity was low back pain (Vos *et al.*, 2012). It is one of the ailments with the largest number of years lived with disability. Patients with late



stage disc disease and pain refractory to medication can only be treated surgically. Between 150 and 200 thousand spinal surgeries are performed annually in the EU. For human patients with severe IVD disease, surgical procedures such as disc excision and vertebral fusion lead to pain relief in the short-term, but they alter spine biomechanics, leading to further degeneration of surrounding tissue and adjacent discs. Failure rate for lumbar fusions is 20% to 40% after five years. Surgical procedures that maintain spine biomechanics, i.e. arthroplasty, have limited longevity and sufficient long-term follow up to determine effects on adjacent structures, e.g. facet joints, is lacking. Furthermore, arthroplasty revisions are challenging and associated with higher morbidity and costs. *Veterinary aspect:* many dogs suffer from the clinical consequences of IVD degeneration, and IVD disease is a relatively common reason for euthanasia (Smolders *et al.*, 2013a). Conservative and surgical therapies may resolve neurological deficits and reduce pain (although in many cases insufficient), but they do not lead to repair of the degenerated IVD. In fact, long-term medication can cause side-effects, surgery can lead to spinal instability and adjacent segment disease, and recurrence of IVD disease may occur (Bach *et al.*, 2014b).

#### **Scientific relevance**

The current project aims at treating chronic neck and low back pain associated with intervertebral disc disease, by inhibition of tissue degeneration and enhancing intrinsic regeneration. Although the widespread use of anti-inflammatory oral medication in chronic low back pain is justifiable, their application is accompanied by several drawbacks. First of all, the route of administration is usually systemic, which entails several side effects, including gastrointestinal side effect and for some drugs even cardiotoxicity. Therefore, local administration is a logical approach. The incorporation of drugs into controlled release carriers for local application will circumvent systemic side effects. Even more so, local sustained release of medication will avoid multiple intradiscal injection, which could induce further degeneration. Based on the basic research part, the proposed project will identify (new) mediators that are crucial in matrix production and inflammation control and hence can be implemented to both degenerative joint and disc disease. Furthermore, it will give insight into the interplay of inflammation and regeneration, into the role of MSCs in biologic repair, into the additive regenerative effect that an advanced treatment strategy may engage where transplanted MSCs are combined with growth factors.

### **3.4 Research strategy**

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

This project encompasses two arms: a basic and translational one.

**A) In the basic research arm,** we identify potential targets by mimicking developmental biology. The promising targets are further developed and validated in *in vitro* studies and small animal models (mice and rats) before they are further translated into a large animal model.

*Rationale:* The young and healthy IVD contains NCs which secrete factors that are essential for the formation and maintenance of the IVD; NC loss is speculated to relate to the initiation of IVD disease. Only recently, NC-conditioned medium has been identified as a promising strategy with anti-inflammatory and regenerative properties (de Vries *et al.*, 2014, Korecki *et al.*, 2010, Potier *et al.*, 2014, Purmessur *et al.*, 2011). Unravelling the [REDACTED] of the NC-secretome will form the basis for the development of effective therapeutic strategies for IVD disease. Furthermore, [REDACTED] profiling of the canine IVD during the onset of degeneration has identified several potent targets. These ongoing "Omic" studies, result into enormous data sets of differentially regulated genes/protein. The data sets are further narrowed down based on medium to high throughput *in vitro* functional assays. Thereafter, transgenic mice are implemented that carry reporters in the promoter region of genes relevant to cartilage regeneration in order to have a translational step from cell lines to the final validation with canine and human primary cells.

**B) In the translational research arm,** potent candidates are evaluated for their efficacy and safety in a large animal model (dog). The translational arm concentrates on development and translation of MSC and/or growth factor-based treatment strategies.

*Rationale:* Multiple growth factors have been identified to induce an anabolic response in small animal models with induced IVD degeneration. Thus far, only Growth Differentiation Factor-5 (GDF-5) is being evaluated in human clinical trial phase I/II. There are ongoing clinical trials where immunoselected allogenic MSCs are being evaluated in a phase I/II. For both growth factors and transplanted MSCs, the results are promising, but are limited to halting the

process of degeneration rather than inducing regeneration with improvement of the IVD height and water content. However, with increased severity of IVD degeneration, the inflammatory activity increases, NP cell numbers decrease and cells become senescent (Heathfield *et al.*, 2008). Hence, bioactive substance (like growth factors) may be ineffective. This indicates that a combinatory treatment of bioactive substance with transplanted MSCs may be a more suitable regenerative strategy for treating severely degenerated IVDs: transplanted MSCs target the decreasing cell numbers and the catabolic/inflammatory IVD environment, while the bioactive substance stimulate the resident CLCs and chondrogenically differentiated MSCs. In case a single growth factor injection is not sufficient to achieve the regenerative effects, sustained release will be pursued with injectable biomaterial platforms.

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

**Key objective 1: Medium to high throughput *in vitro* functional assays** to identify the biological potency of identified targets. This objective will also help determine the exploitation potential of the selected bioactive substances towards regenerative treatment strategies for IVD disease.

*Approach:* A three-stage approach will be set up in order to narrow down the targets derived from “-omics” studies, with focus on matrix production and inflammation control, and reduce the number of animals employed. The first stage is animal-free and employs an established cartilage cell line, the ATDC5. (Bach *et al.*, 2014b) ATDC5 are retrovirally transduced with a vector encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) driven by the human collagen type 2 promoter to monitor chondrogenesis. Given eicosanoids formed via the cyclooxygenase (COX) pathways are major players in various inflammatory and degenerative disorders, COX-2 activity will be determined by a colorimetric method after initial stimulation by a range of TNF $\alpha$ /IL1 concentrations. A subset of the targets will be studied in the second stage in primary chondrocytes isolated from transgenic mice harboring a fluorescent reporter based on collagen 2. (Bach *et al.*, 2014b, Tryfonidou *et al.*, 2011) These mice enable isolation of a pure population of proliferating chondrocytes. In this *in vitro* model chondrogenesis and inflammation control will be studied in micro-aggregates in the presence of the selected library of peptides and/or miRNAs based on the observed biologic effects in stage 1. The most promising targets will be functionally studied/validated in the third animal-free stage over a longer period of time in a 3D-culture. Herein primary human and canine CLCs isolated from degenerated discs readily available through the Biobank will be used, as a last translational step towards the follow up *in vivo* studies. Transcription factor-miRNA-target gene networks associated with IVD health will help determine miRNA master regulators that will be validated by mechanistic miRNA studies.

**Key objective 2: Delineate the role of caveolin-1 in IVD (patho) physiology.** This objective is a collaborative project with the University of Hong Kong and the Tokai University School of Medicine and is supported with funding by the AO Spine Research Network.

*Approach:* We will characterize the IVD phenotype and the concomitant changes in signaling pathways related to IVD degeneration/regeneration during the development of the NP (prenatal) and during aging (postnatal) of caveolin 1 KO and WT mice with similar genetic background. These studies will be conducted employing the following techniques: [REDACTED] and immunofluorescence/histochemistry of relevant proteins.

**Key objective 3: Identify bioactive targets secreted by NCs that have a regenerative capacity** and translate this with the aid of the rat model where IVD degeneration is induced with aid of puncture. This is an objective that we address in collaboration with Prof. dr. [REDACTED] (TU Eindhoven) and dr. [REDACTED] (UMC Utrecht).

*Approach:* We are at the process of further determining which protein(s) are responsible for the anabolic CLC response (mass spectrometry). After identification, these proteins will be synthesized and tested *in vitro* both on cells (described under key objective 1) and on tissue explants for their biological potency. The most promising candidates will be tested - either alone or in combination with transplantation of MSCs - in a rat model where degeneration is induced by puncture in tail IVDs. This small animal model is employed as a first step of translation with specific objectives safety and dose finding. Only if these candidates appear to be safe and efficient in inducing a regenerative response, the selected bioactive substance will be further translated in a large animal model (dog).

**Key objective 4: Translation of MSCs and/or bioactive substances based treatment strategies for IVD disease in large experimental animal model.** Bioactive substances as identified under objective 3, validated for the potency based on studies done under objective 1&3 will be further developed to demonstrate their biological potency in a proof-of-concept large animal model as the last pre-clinical step in the translation process before moving on to

clinical trials in canine and human patients.

*Approach:* One of the promising bioactive substances with regenerative potential, the N-terminus of Link protein (Link-N) will be studied at the initiation of the project. Link-N is addressed in collaboration with [REDACTED] (TU Eindhoven & UMC Utrecht) and [REDACTED] (Orthopaedics Research LAB McGill University, Lady Davis Institute, Montreal, Canada). Other bioactive substances identified over the course of the project will be addressed in a similar manner. The regenerative effects of the bioactive substance alone or in combination with MSC transplantation will be studied in the canine model of mild and severe IVD degeneration by means of longitudinal quantitative MR imaging followed by post mortem biomolecular, biochemical, and histological measures.

**Key objective 5: Demonstrate safety and efficacy of sustained release of the bioactive substance by injectable biomaterials loaded with the bioactive substance.**

*Approach:* If a second injection of the bioactive substance (e.g. Link-N or [REDACTED] key objective 4) appears to have an additive regenerative effect over a single injection in vivo in the experimental animal, the bioactive substance will be incorporated in an injectable biomaterial platform that effectuates sustained release over a prolonged time period. The word "platform" is used here as many biomaterials can be used in different forms, e.g. as solid scaffolds, hydrogels or microspheres. In this project, only injectable biomaterials will be used; scaffolds are not applicable here. Typical biomaterial forms used in this study are microspheres and hydrogels. At this stage, the biomaterial platform cannot be specifically defined given that we have to determine which platform is best suitable for the chosen bioactive substance based on its chemical properties. This is determined in collaboration with industry. As soon as *in vitro* sustained release of the bioactive substance is achieved and the necessary work has been conducted to prove safety (cytotoxicity, *in vitro* studies on the anabolic effects of sustained release of the bioactive substance compared with a single bolus treatment), a dose-response study will be conducted in a validated rat model where IVD degeneration is induced in the tail by needle puncture.

---

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

This project aims at biological repair of the diseased IVD by combining basic and translational research. The coherence between the different components of the project is also illustrated in the supplemented figure (Appendix of the proposal).

With the aid of basic research, technological tools are developed to validate promising targets (key objective 1). One of these promising targets, readily identified by means of an "omic" study, i.e. caveolin-1 (key objective 2), is further explored with KO and WT mice with the same background. Key objective 3 studies the regenerative bioactive substances present within NC-conditioned medium. As soon as the proteomic analysis has been completed, the set of promising targets will be further studied with the medium throughput platform developed under key objective 1. Targets with proven regenerative and anti-inflammatory capacities will be selected for further translation with aid of a rat model where IVD degeneration is induced in the tails IVDs by needle puncture. In parallel, key objective 4 concentrates on translating readily identified targets into a large animal model (dog). Note that such targets already have proven to be effective by us or others in small animal models. A readily available bioactive substance, Link-N will be studied within the course of the first year of the project. In the follow up period of the project, only bioactive substances that have been shown to be safe and have a regenerative effect at least in small animal models (by others or within this project under key objective 3) will be employed. If it appears that sustained delivery of the bioactive substance has advantages over a single injection, a biomaterial platform will be developed that effectuates sustained release of the bioactive substance (key objective 5). After safety has been proven *in vitro* (cytotoxicity, studies on the anabolic effects of sustained release of Link-N compared with a single bolus treatment), a dose-response study will be conducted in the rat model. After dose finding, the developed regenerative strategy is further translated in a large animal model (dog) before further translation in a phase I clinical study in canine and human patients.

---

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

Serial number	Type of animal procedure
---------------	--------------------------

1	Isolation of primary pd2EGFP+ chondrocytes from Col2-pd2EGFP reporter mice
2	Studying the IVD phenotype of Caveolin-1 KO mice
3	Rat model with induced IVD degeneration
4	Canine model of IVD degeneration (mild and severe degeneration)
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 1             | Isolation of primary pd2EGFP+ chondrocytes from Col2-pd2EGFP reporter mice |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

This project aims to develop medium to high throughput functional assays to identify the biological potency of identified targets. This objective will also help determine the exploitation potential of the selected bioactive substances towards regenerative treatment strategies for intervertebral disc (IVD) disease. A readily available mouse model is employed (Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrecht; Tryfonidou et al., 2011). The research

group has experience with the isolation of pure chondrocyte populations and the micro-aggregate culture systems (Bach et al., 2014) of primary pd2EGFP chondrocytes. In this respect, mice are euthanized and post-mortem all cartilaginous tissues are collected, digested and thereafter pd2EGFP-positive chondrocytes are collected by means of cell sorting (FACS).

#### References:

Bach FC, Rutten K, Hendriks K, Riemers FM, Cornelissen P, de Bruin A, Arkesteijn GJ, Wubbolts R, Horton WA, Penning LC, Tryfonidou MA (2014) The paracrine feedback loop between vitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)) and PTHrP in prehypertrophic chondrocytes. *J Cell Physiol* 229: 1999-2014.  
Tryfonidou MA, Lunstrum GP, Hendriks K, Riemers FM, Wubbolts R, Hazewinkel HA, Degnin CR, Horton WA (2011) Novel type II collagen reporter mice: New tool for assessing collagen 2 $\alpha$ 1 expression in vivo and in vitro. *Dev Dyn.* Mar;240(3):663-73.

---

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

Female and male col2-pd2EGFP reporter mice are not subjected to experimental procedures; they are being euthanized at the designated age (1 week old) to collect the cartilaginous tissues. These experiments are planned in such a way, that the back-up colony is maintained with a low breeding profile (i.e. 2-3 breedings pairs), and only when tissues are needed, more breeding pairs are formed.

---

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

The generation of off-spings cannot be subjected to statistical power analysis. In order to minimise the number of animals the following considerations have been done:

- (1) mice are being euthanized at the designated age that gives the highest yield of primary chondrocytes
- (2) chondrocytes are stored at P0. Approximately, 1 million P0 chondrocytes are harvested per mouse. In vitro experiments are primarily performed with P2 cells and per 1 million P0 cells 6 million P2 cells are generated after monolayer expansion. At P2 the cells are cultured in high-density micro-masses that induces their re-differentiation in the chondrocytic lineage.

---

## **B. The animals**

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

We have imported the mice from the Shriners Children Hospital, Portland, Oregon. We [REDACTED]. The planned studies have not been conducted before. Other available chondrocyte cell lines that have been shown not to perform properly for studies in cartilage biology. Isolation of pure chondrocyte populations from mice is challenging on the basis that mice are too small for accurate dissection of the cartilaginous tissues. This is overcome by the col2-pd2EGFP reporter mice. These mice carry a pd2EGFP in the collagen 2 promoter. When collagen 2 is transcribed, then also pd2EGFP is produced; the latter is visual in fluorescence and confocal imaging and can be employed to sort the pd2EGFP positive cells. Even more so, the pd2EGFP is characterized by a short half life of 2 hrs, and hence only cells with active transcription of collagen 2 are isolated and imaged. This mouse strain enables the development of medium to high throughput functional assay employing primary chondrocytes, rather than the available cell lines, that do not possess the proper cartilage characteristics.

Can the results from these experiments be translated to humans and other species? This animal model is used as a second step to further narrow down the targets employed before further in vitro experiments are performed with primary cells from humans and canines. Mouse models are being extensively used as a model to translate results/understand pathophysiological mechanisms in vivo. The model employed in this project is novel. However, pd2EGFP-chondrocytes have been employed before to study chondrocyte (patho)physiology and have been shown to respond in a similar manner to external stimuli (Bach et al. 2014).

Adult female and male mice are employed for breeding, their offsprings are euthanized at the age of 1 week to isolate pure population of primary chondrocytes. Mice at the age of 1 week have been chosen on the basis that (a) cartilaginous structures can be dissected under the stereoscope with magnification, (b) the cartilaginous skeleton at this age is very active, and hence most of the chondrocytes express the pd2EGFP and thereby high yields of chondrocytes per mouse are achieved.

In this project we will set up the medium throughput functional assay based on the pd2EGFP-chondrocytes. In the first and second year of the project we expect to need 25 mice/year; thereafter it is estimated that 10 mice per year will be needed to run the functional assays. A total of 80 mice will be used. These will be generated from breeding pairs of female and male mice, estimated to be 2-3 pairs in the first two years and 1-2 pairs per year for the last three years of the project.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: This objective relies on a three-stage approach. In the first stage, an established cell line is being employed in order to narrow down the initial set of bioactive substances (this supports the reduction of experimental animals used). In the second stage of the approach, a readily available mouse model is employed (Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrecht).

Reduction: in vitro experiments are done primarily with P2 cells, which leads to reduction of the initial animals needed to generate the numbers of chondrocytes needed to run the experiments. Furthermore, the in vitro system has been down-scaled and from each micro-mass several read out parameters can be deduced leading to reduction of the micro-masses needed per bioactive substance to evaluate its biological activity. Automated image acquisition will concentrate on the short term differentiation (7 days) to monitor aggregate size and quantify intracellular pd2EGFP expression. Biochemical measurements of GAG and DNA content will allow determination of matrix deposition.

Refinement: This model is a unique model enables the isolation of pure populations of chondrocytes from mice. Furthermore, it relies on the expression of pd2EGFP, which has a short half life, and thereby only chondrocytes are detected in culture that actively transcribe collagen 2. This enables us to identify the biological potency of the targets that are being tested in the in vitro platform in a fast and reliable way.

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

Animals are housed in litters, after the age of 3 weeks male and female mice are grouped separately and grouped when breeding is initiated. The animals are not subjected to experimental procedures until they are killed.

---

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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



None

Explain why these effects may emerge.

not applicable

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

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

During the period before the animals are killed (breeding pairs, offspring) general clinical signs are observed. If clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized.

Indicate the likely incidence.

### K. Classification of severity of procedures

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

mild

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect the growing cartilaginous tissues

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number                  | Type of animal procedure  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Studying the IVD phenotype of Caveolin-1 KO mice"/> |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

Preliminary studies have conducted on the basis of an earlier DEC application (2011.III.12.121) and have shown that caveolin-1 KO mice have an IVD phenotype. Caveolin-1 plays a crucial role in preservation of murine notochordal cells (NCs), underscored by the IVD phenotype of 3-month-old caveolin-1 KO mice (Smolders et al., 2013). The nucleus pulposus (NP) of WT mice contained numerous viable NCs, whereas the NP of caveolin-1 KO mice contained

abundant chondroid-like matrix with relatively few, mainly apoptotic, chondrocyte-like-cells similar to a degenerating NP. Furthermore, preliminary studies reveal that in WT mice NC numbers did not considerably change during ageing, whereas NP cell numbers of caveolin-1 KO mice decreased over time. The proportion of positively stained TUNEL cell nuclei (TUNEL ratio) was significantly higher in NPs of caveolin-1 KO mice than in NPs of WT mice. This indicates that in vivo knockout of caveolin-1 induced apoptosis, and hence lead to lower NP cell numbers during aging. These results altogether indicate that caveolin-1 is implicated in NC-physiology and may have a role not only in preserving the NC-population but also play a role in the activation of the resident progenitor cells.

In order to further understand the IVD phenotype of caveolin-1 KO mice and thereby determine the role of caveolin-1 in IVD physiology and IVD degeneration, pre-natal and post-natal mice will be studied. On the basis that IVD are formed during the period of E14-E15, prenatal embryo of this age will be sacrificed. In the postnatal period, mice of the following age will be investigated, at 3 and 6 weeks of age, and at 3, 6, and 9 months of age. Where possible surplus mice will be used for this purpose. The latter is applicable to post-natal mice, where for example mice at the age of 3, 6, and 9 months that have been used for breeding are killed.

#### Reference:

Smolders LA, Meij BP, Onis D, Riemers FM, Bergknot N, Wubbolts R, Grinwis GC, Houweling M, Groot Koerkamp MJ, van Leenen D, Holstege FC, Hazewinkel HA, Creemers LB, Penning LC, Tryfonidou MA (2013) Gene expression profiling of early intervertebral disc degeneration reveals a down-regulation of canonical Wnt signaling and caveolin-1 expression: implications for development of regenerative strategies. *Arthritis Res Ther* 15: R23.

---

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

Female and male Caveolin-1 KO mice and WT mice on the same genetic background are not subjected to experimental procedures; they are being euthanized at the designated ages to collect the spine. Initially, 3 mice of each sex and each age category will be collected and studied. Thereafter, additional mice will be purposefully bred to extend the studies for a specific age-category. These experiments are planned in such a way, that the back-up colony is maintained with a low breeding profile (i.e. 2-3 breeding pairs), and only when IVDs are needed, more breeding pairs are formed.

---

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

These in vivo experiments cannot be subjected to statistical power analysis. In order to minimise the number of animals the following considerations have been done:

(1) The caveolin-1 KO mice have a very distinct IVD phenotype at the age of 3 months characterized by (a) a phenotypic change in the cell-type: chondrocyte like cells are present and notochordal cells have disappeared, (b) biochemical composition: matrix very rich in collagen type 2 and glycosaminoglycans (GAG), (c) more cell apoptosis. The latter has been quantified in mice of three different ages, i.e. at 6 weeks, 3 months and 6 months and has been employed to calculate the Cohen's d size effect: it increases with increasing age, being 1.3 at 6 weeks and 4.1 at 6 months. The observed variance was 10-15% in each studied age.

(2) Given the distinct differences in IVD phenotype, mice are being euthanized at designated ages (n=3 per sex and per age) in order to identify which age categories are the ones that need further studying and additional mice are needed to cover for the biologically relevant variance.

(3) From each collected spine, we can determine all read out parameters indicating that each mouse contributes as an individual to all the parameters determined. The lumbar spine is employed for histopathological and immunohistochemical analysis, while the cervical spine is employed for biomolecular analysis. With regard to the latter, it is within the scope of the project to collect NP tissue from caveolin-1 KO and WT mice, isolate the NP and subject it to RNAseq analysis (technique up and running in mice in collaboration with ██████████, Honk Kong University)

---

## B. The animals

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

The caveolin-1 KO mice and the WT mice on the same genetic background are readily available at the facilities of the GDL. A broad range of life ages has been chosen in order to cover the development of the IVD, its maturation, and follow the degeneration process at later ages.

How relevant are these experiments for humans and other species? By understanding the *in vivo* role of caveolin-1 in IVD (patho)physiology we will be able to further develop and finetune regenerative treatment strategies based on caveolin-1. In this respect, based on preliminary *in vitro* studies, there is evidence that the supplementation of caveolin-1 using a peptide that encodes for the scaffolding domain of caveolin-1 and thereby mimics the biologic actions of caveolin-1, results into a matrix anabolic response in disc cells isolated from degenerated IVDs. Furthermore, based on studies with caveolin-1 KO mice it has been shown that caveolin-1 has a strong anti-inflammatory role (in a model of lung infection) indicating that it may also play a role as an anti-inflammatory mediator in the degenerative process of the IVD.

In order to further understand the IVD phenotype of caveolin-1 KO mice and thereby determine the role of caveolin-1 in IVD physiology and IVD degeneration, pre-natal and post-natal mice will be studied. On the basis that IVDs are formed during the period of E14-E15, prenatal embryos of this age will be sacrificed. In the postnatal period, mice of the following age will be investigated, at 3 and 6 weeks of age, and at 3, 6, and 9 months of age. Three female and 3 male mice of each age category will be studied. Based on the planned experiments and questions that need to be addressed, we expect to use approximately 35 mice per strain in the 1st year; and thereafter 20 mice per strain /year for the remaining 4 years. That is a total of 230 for both caveolin-1 KO and wild type mice.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: *In vitro* studies with primary NP cells collected from canines euthanized for other unrelated experiments are done in order to perform functional studies on the role of caveolin-1 in IVD degeneration and regeneration. The caveolin-1 KO mice are employed in order to understand the role of caveolin-1 *in vivo*, where all signalling pathways are present and may interact with each other. Caveolin-1 has a tissue- and context-dependent effect and thereby *in vivo* studies with these mice cannot be replaced with *in vitro* experiments.

Reduction: For the later life stages, surplus mice that have been employed for the "back up" breeding of both colonies will be used as much as possible. Furthermore, further reduction of the animals used is achieved by collaborating with [REDACTED], who uses the same mouse strains for studies on liver lipodosis & regeneration. In this way, terminal experiments performed on studies regarding the liver, are notified to us and we collect the spines of the mice for further analysis.

Refinement: from each mouse spine, several read out parameters are achieved, including histology, biomolecular and biochemical analysis of the IVDs.

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

Animals are housed in litters, after the age of 3 weeks male and female mice are grouped separately to prevent unplanned breeding. The animals are not subjected to experimental procedures until they are killed.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

None

Explain why these effects may emerge.

not applicable. The absence of caveolin-1 is related to a pulmonary and cardiovascular system phenotype. Several other systems are also affected, including muscles, skeletal system and the immune system. Thus far, there have been no clinical signs related to IVD disease in mice of older age, i.e. at the age of 6 months. Based on reports from the Jackson laboratories, caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.

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

Caveolin-1 KO mice have increased susceptibility to bacterial infection and related morbidity. In order to minimize the risk for infection and morbidity mice are maintained in the SPF or in filter-top cages.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

During the period before the animals are killed (breeding pairs, offspring) general clinical signs are observed. If clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized.

Indicate the likely incidence.

Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.

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

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

mild; Thus far, there have been no clinical signs related to IVD disease in mice of older age, i.e. at the age of 6 months.

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect the spines and study the IVD phenotype

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number                  | Type of animal procedure   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Rat model with induced IVD degeneration"/> |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

Rats are allowed to acclimatize for at least 1 week and thereafter the experiments are initiated. Four weeks before the initiation of the study, the caudal IVDs are punctured in a minimally invasive manner under fluoroscopic guidance and general anesthesia. Degeneration of the caudal IVDs occurs over the course of 4 weeks and is confirmed by means of radiography 4 weeks after induction. In studies where mesenchymal stem cells (MSCs) are employed: prior to



treatment, other rat donors are sacrificed to collect and expand MSCs. These MSCs will be expanded in the laboratory until Passage 1 and thereafter properly biobanked. For this purpose, surplus rats from the same strain are being employed, if available. MSCs are biobanked so that only a limited number of animals is needed to create the necessary population of MSCs.

At T=0 (start of the treatment), the bioactive substance and/or MSCs will be injected into the rat caudal IVDs on the side contralateral to the annular puncture. All injections will be done under general anesthesia and under fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection. At T=3 months after injection of the bioactive substance and/or MSCs, the in vivo experiment will be terminated; rats will be euthanized.

Read out parameters

In vivo:

Potential regenerative effects will be studied by obtaining conventional radiographic images at T=-4 weeks prior to induction of degeneration (under sedation), at T=0 (time of treatment, under sedation), at T=3 months (directly post-mortem). The primary read out parameter is the percentage of change of the Disc height Index (DHI) for each IVD.

Post-mortem:

a. Radiography and micro-computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors and/or MSCs.

b. Thereafter, rat tails will be harvested and further divided in spinal units (½ vertebra – endplate – IVD – endplate – ½ vertebra). IVDs will be accordingly processed for biochemical analyses of the NP and AF separately and/or after macroscopic evaluation will be fixed, decalcified, and thereafter subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and immunohistochemical stainings). Each IVD can either be employed for biochemical, or biomolecular or histopathological analysis.

c. In experiments where the MSC fate at 3 months needs to be determined, [REDACTED] rats are employed for the in vivo experiment and [REDACTED] donors are employed for MSCs. In this way, in [REDACTED] IVDs the presence of [REDACTED] DNA can be studied by means of qPCR. Cell tracking of male DNA is achieved by up and running qPCR for the presence of [REDACTED] corrected for housekeeping reference genes like GAPDH expression. Given that there is no specific gene for [REDACTED] cell tracking experiments can only be set up in this combination ([REDACTED] rat recipient, [REDACTED] rat donor)

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

IVD degeneration is induced in caudal IVDs of rats under general anesthesia and proper analgesia. In total the procedure will take about 30-45 minutes and estimated to be of mild severity.

Degeneration of the caudal IVDs occurs after a single puncture. Over the course of 4 weeks degeneration progresses and is confirmed by means of fluoroscopy under general anesthesia 4 weeks after induction (Zhang et al. 2011). The severity of the procedure is mild.

All strategies employed within this project rely on the employment of minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle, in which the bioactive substance alone, or loaded on a biomaterial that effectuates sustained release of the bioactive substance is injected once. The volume injected in each IVD is adapted in order not to induce IVD degeneration (Mao et al., 2011). In this way, the injectable treatment itself does not disturb the balance of the IVD. In studies of biocompatibility/safety, duration of the treatment is limited to 4 weeks after application of the injectable treatment, while in studies where also efficacy is studied, the duration of the study is 3 months after application of the injectable treatment. In the studies of efficacy, a first experiment explores a dose-range, in which 3 different dosages are being tested for safety and efficacy on a relatively short term (4

weeks) and after the ideal dose has been determined a final experiment is conducted where efficacy is studied with 3 months follow up. The severity of this procedure is mild.

#### References

Mao HJ1, Chen QX, Han B, Li FC, Feng J, Shi ZL, Lin M, Wang J. The effect of injection volume on disc degeneration in a rat tail model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Jul 15;36(16):E1062-9.

Zhang H1, Yang S, Wang L, Park P, La Marca F, Hollister SJ, Lin CY. Time course investigation of intervertebral disc degeneration produced by needle-stab injury of the rat caudal spine: laboratory investigation. *J Neurosurg Spine*. 2011 Oct;15(4):404-13.

---

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: disc height index. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.008 ( $\alpha=0.05 / 5$ , in case of much number of treatment groups to be studied ), and assuming standard deviations as observed in previous studies: in the rat degenerative disc model in which variation of 15% was observed after induction of IVD degeneration and a variation of 15-20% was observed after injection of a bioactive substance with a significant biologic effect, 4 IVDs is the minimum IVDs in each group to observe significant differences. On the basis that degeneration may fail to occur in a disc, we have included an additional IVD in each group.

In order to minimize the number of animals employed per study and to minimize the "RAT" effect as random effect, we employ a block design of the study. Hence, based on power analysis, 10 rats would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal fluoroscopy and post-mortem biochemical (n=5 rats), and histological analysis (n=5 rats). When biomolecular analysis is needed for functional analysis, additional rats will be included in the study, given that biomolecular analysis will employ the whole IVD.

All in vivo studies are approached in this manner and depend on the expected effect and the documented variation, we select the appropriate number of animals. When estimation of the size effect is not possible based on the available information, a pilot study with n=3 IVDs per treatment group in 3 rats will be conducted. Based on these findings, proper power analysis will determine the minimum number of IVDs/rats needed.

---

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

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

Sprague Dawley rats are employed from a registered company (for example Harlan) on the basis that this strain is also used by other spine researcher and thereby results can be compared between studies. Rats develop degeneration by a simple puncture of the caudal IVD and the severity of the procedure is mild, in contrast to the procedure used in the dog model (Appendix no 1) where induction of IVD degeneration is considered moderate. In order to minimize animal suffering we have chosen to work with rats as a first approach of choosing the proper dose range to be studied.

Rats at the age of 12-14 weeks are being employed in the study so that they have reached skeletal maturity and the problems of IVD remodeling due to skeletal growth can be eliminated. We prefer to use [REDACTED] rats, since [REDACTED] rats are known to continue with growing at even later ages than [REDACTED] rats and can hence influence IVD remodeling, can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up. Furthermore, in studies where we want to determine the fate of mesenchymal stem cells after intra-discal application, tracking of [REDACTED] DNA can be done by means of qPCR on the [REDACTED] gene. "Specific" [REDACTED] genes are not available for this procedure and thereby only the combination of [REDACTED] rat recipient and [REDACTED] mesenchymal stem cell donor is feasible for these studies.

Gender is expected not to influence the study. No effects have been described of progesterone on regeneration of tissue by NP cells and only two studies

mention that estradiol can protect against induced cell death. As this is very limited and restricted to artificially induced cell death, and in human nor canine patients a connection between gender and disc degeneration was found, also at menopausal age, it is very unlikely that any effect of cycle will be evident.

Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to use 50 rats max for this purpose in the period of 2015-2020. In these number, are also 10 rats included to be used in pilot experiments, including 5 rats to set up the animal model in our facilities.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: These studies cannot be replaced with simple in vitro models or explant tissue cultures given that we need to translate the treatment strategies not only in a tissue-context but also a disease dependent-context where multiple signalling pathways are deranged. We address the challenges of this collaborative project by employing as a final step of translation the unique spontaneous diseased canine model, the use of cutting edge biomolecular techniques and strong implementation of the 3Rs. Within this project, the rat model with induced IVD degeneration serves as a preclinical model for translation towards the in vivo studies in large animal models (dog), while it serves also the veterinary patient.

The UU will develop the rat model of induced IVD degeneration as a preclinical/screening platform, before taking the step towards a large animal model like the dog (Replacement). In experimental rats randomized block design strengthen the power of the studies (Reduction) and longitudinal follow up of the animals is done by fluoroscopy. The rat model is on the overall less severe as experimental animal procedure compared to the dog animal model described under Appendix no 4 (both moderate severity but in rats 5 levels and in dog 8 levels). Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, and imaging are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI). Up to 5 caudal IVDs can be treated within in one experimental rat, indicating that up to 5 treatment groups can be included in a randomized block design study. The research group plans the experiment in an efficient way so that all IVDs are included in the study in order to minimize the number of animals. Post mortem analysis is performed by state-of-the-art and up an running techniques of histology, biomolecular, and biochemical analysis (Refinement).

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one day post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

Occasionally wound healing may be delayed or wounds may become superficially infected; in that case the rat may have to be housed solitary for a short period of time.

Explain why these effects may emerge.

Occasionally rats tend to chew on each other wounds when housed in groups. Given that the induction of IVD degeneration is done in a minimally invasive way whereby the skin and IVD is punctured with a 21G needle, there may be a small puncture hole that will have to heal secondarily.

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

During the first pilot experiment, the effect of the IVD puncture will be assessed. If the 21G needle leaves substantial skin wounds, the rats will be housed individually for one day after the treatment.

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

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

No > Continue with question K.

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

During the period before the animals are killed general clinical signs are observed. If clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized. Specific clinical signs related to the model may be extensive infection of the tail. The latter is considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

literature does not report specific complications to this animal model and contact with researchers employing the model did not indicate that this is likely to happen.

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

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

mild

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect post-mortem information that is very important in order to define the effect of the regenerative treatment and also understand the underlying mechanism of action

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

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

Yes





## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 4             | Canine model of IVD degeneration (mild and severe degeneration) |

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

### 2 Description of animal procedures

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

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

At the initiation of the in vivo study, all experimental dogs will undergo general clinical and orthopedic examination and will be subjected to MRI to determine the grade of IVD degeneration by means of Pfirrmann scoring. (Bergknut, Rutges et al. 2012) MRI will be performed with a 1.5 Tesla scanner using a Spine array coil (Philips Healthcare, Best, The Netherlands). Six weeks before the start of treatment, up to 5 lumbar IVDs per dog can undergo nucleotomy as

follows: under fluoroscopic guidance a needle will be inserted to center of the disc and the nucleus pulposus (NP) will be aspirated. Equal volumes of NP tissue will be removed from each IVD and confirmed by weighing the nucleotomized tissue on a micro-balance. To confirm that degenerated Pfirrmann grade 4-5 discs are indeed created by this procedure, an MRI will be performed at T=0 months, i.e. 6 weeks after induction of IVD degeneration.

In studies where mesenchymal stem cells (MSCs) are employed: MSCs originating from [REDACTED] beagle donors (readily available in the biobank of UU) will be expanded until Passage 2 in the laboratory. (Tryfonidou, Schumann et al. 2014) Prior to intradiscal transplantation, the MSCs will be analyzed with FACS for canine MSC markers, and their differentiation potential will be tested for three lineages (adipogenic, chondrogenic, and osteogenic) according to up and running protocols.

At T=0 (start of the treatment), the bioactive substance and/or BMSCs will be injected into the canine IVDs on the side contralateral to the annular puncture, if applicable. All injections will be done under fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection. At T=3 months, a second dose of the bioactive substance will be injected in the designated IVDs under fluoroscopic guidance. At T=6 months, the in vivo experiment will be terminated and dogs will be euthanized.

Read out parameters

In vivo:

Potential regenerative effects will be studied by obtaining conventional T2-weighted images and quantitative MR imaging in a longitudinal manner. At all-time points, i.e. at T=-6 weeks (baseline, at induction of severe disc degeneration), at T=0 (time of treatment), at T=3 months and T=6 months (follow-up after treatment and at second injection), the following read out parameters will be determined:

- Pfirrmann grade of mid-sagittal slices of T2-weighted images (Bergknut, Rutges et al. 2012)
- Disc height index (DHI) will be calculated on T2W images for each IVD
- For analysis of quantitative MR images, values will be computed by calculating the mean signal intensity in each range of interest containing the nucleus pulposus.

Post-mortem:

- Radiography and computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors and/or MSCs.
- Thereafter, the vertebral column (T12 – S1) will be harvested and further divided in spinal units (½ vertebra – endplate – IVD – endplate – ½ vertebra). Each unit will be transected sagittally into two identical parts. One part will be used for biochemical and biomolecular analyses of the NP and AF separately in order to determine transcriptional regulation by the treatment and the regenerative response in terms of matrix remodeling. The other part, after macroscopic evaluation (Thompson score), will be fixed, decalcified, and thereafter subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and immunohistochemical stainings).
- In experiments where the fate of BMSCs need to be determined, [REDACTED] dogs will be employed for the studies. The BMSCs that will be injected are of [REDACTED] origin and are not expected to cause graft versus host disease given that the IVD is a confined environment. Current clinical trials in humans are also conducted with allogeneic MSCs. The MSC fate at 6 months follow up will be determined by means of [REDACTED] on the presence of [REDACTED] DNA. Cell tracking of [REDACTED] DNA is achieved by up and running [REDACTED] for the presence of [REDACTED] genomic DNA for [REDACTED]. Specific [REDACTED] " genes for tracking of cell fate post mortem are not available. Hence, these studies can only be performed in this combination: [REDACTED] dog recipient, [REDACTED] dog MSC donor.



---

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

Dependent on the question and the treatment strategy investigated we will study the effect of the regenerative strategies in mild and severe IVD degeneration. Beagle dogs older than 1 year have in all IVDs mild degeneration. Severe degeneration of the IVD with evident loss of disc height is induced by puncture of the IVDs.

Clinical and orthopedic examination: is performed at 4 times during the study and more often if needed to determine the welfare status of the animals (mild procedure).

MRI is performed 4 times under general anesthesia and is considered a mild procedure. MRI is performed in order to detect degenerative changes and the regenerative response of the treated IVDs in a longitudinal manner.

Nucleotomy is done under general anesthesia and a minimal surgical approach in order to induce disc degeneration. This procedure is conducted once at the initiation of the study and the severity is considered moderate.

All strategies employed within this project rely on the employment of minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle, in which the bioactive substance alone, or loaded on a biomaterial that effectuates sustained release of the bioactive substance is injected once under general anesthesia. In specific objectives where the advantages of controlled release have not been shown yet, the treatment is repeated after 3 months. In studies of safety, duration of the treatment is limited to 3 months, while in studies where also efficacy is studied, the duration of the study is 6 months post injections. The severity of this procedure is considered mild.

---

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: disc height index. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.8% ( $\alpha=0.008$ , 6 comparisons), and assuming standard deviations as observed in previous studies: in the canine degenerative disc model in which variation of 15% was observed after MSC transplantation (Serigano, Sakai et al. 2010) and in the rabbit degenerative disc model variation of 15-20% was observed after injection of a bioactive substance with a significant biologic effect (Mwale, Masuda et al. 2011), four discs should be sufficient in each group to observe significant differences. In order to minimize the number of animals employed per study and to minimize the dog effect as random effect, we employ a block design of the study. Hence, in this specific example, four beagle dogs would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal quantitative MR imaging and post-mortem biomolecular, biochemical, and histological analysis. Given that we cannot exclude a drop out of one of the treatment groups where IVD degeneration is induced and the severity of disc degeneration has not achieved to be a Pfirrmann grade 4-5, we will include one extra dog in the study to ensure  $n=4$  per treatment group.

All in vivo studies are approached in this manner and, dependent on the expected effect and the documented variation, we will select the appropriate number of animals.

---

## **B. The animals**

---

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

The canine species is considered to be a suitable model to study the process of IVD degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar clinical, macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans. The Utrecht referral animal university clinic frequently encounters canine patients with back pain and neurologic deficits due to IVD disease. Hence the dog serves as a preclinical model for translation towards the "first in man" studies, while it serves also the veterinary patient.

Each in vivo study is performed on the lumbar IVDs of adult Beagle dogs older than 1 year in order to have early degenerated IVDs and not older than 3 years. This range of age results into a cohort of animals with degenerated IVDs with a Pfirrmann score of 2-3. Animals are ordered at Harlan or Marshal

laboratories dependent on the availability and the age.

Regarding the sex of animals: There is very limited evidence with regard to the role of gender in experimental dogs and its possible effects on IVD degeneration primarily because this has not been consistently studied in the literature. In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients (Smolders et al 2013), hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predilection also for the human population of patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011).

In short term studies (range of 3 months) we aim at having a sex ratio of 1:1 in the study cohort in order to have both sexes represented in the study. In long term studies of > 6 months, we preferably work with [REDACTED] dogs in order not to have issues with the cyclus of [REDACTED] dogs. F [REDACTED] dogs have twice a year an oestrus cycle and when not used for breeding castration is advised in order to diminish the risk for development of breast cancer and other complications of irregularities of the cycle, including pseudopregnancy and pyometras, and accidental fertilisation can not be excluded during long term housing of the animals. For this reason, [REDACTED] dogs when not used for breeding should be sterilised, which would add another experimental procedure with moderate severity.

Specifically for studies where we want to track the fate of transplanted MSCs after a long term follow up, we need to work with [REDACTED] Beagle dogs that receive [REDACTED] MSCs during the transplantation procedure and thereby enables tracking [REDACTED] MSCs by means of the [REDACTED]

Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to use 25 dogs in the period of 2015-2020

#### References:

Siemionow et al. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. Spine (Phila Pa 1976). 2011 Aug 1; 36(17): 1333–1339.

Smolders LA et al. Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: chondrodystrophic and non-chondrodystrophic breeds. Vet J. 2013 Mar;195(3):292-9.

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: These studies cannot be replaced with simple in vitro models or explant tissue cultures given that we need to translate the treatment strategies

not only in a tissue-context but also a disease dependent-context where multiple signalling pathways are deranged. Therefore, we address the challenges of this collaborative project by employing the unique spontaneous diseased canine model, the use of cutting edge biomolecular techniques and strong implementation of the 3Rs. In this respect, the dog serves as a preclinical model for translation towards the "first in man" studies, while it serves also the veterinary patient. The Utrecht referral animal university clinic frequently encounters canine patients with back pain and neurologic deficits due to IVD disease. The canine species is considered to be a suitable model to study the process of IVD degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans. (Bergknut, Rutges et al. 2012).

The UU has developed a preclinical platform employing the Beagle dog as an experimental animal and veterinary patients with chronic low back pain (Figure in Appendix). In experimental animals randomized block design strengthen the power of the studies (Reduction) and longitudinal follow up of the animals is done by modern imaging techniques (1.5T Magnetic Resonance Imaging and 64-slice Computer Tomography) and objective gait analysis (force plate). Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, imaging and force plate analysis are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), neurology (ECVN), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI). For the laboratory dogs, post mortem analysis is performed by histology, biomolecular, and biochemical analysis from each IVD of the lumbar spine (Refinement).

In order to further minimize the number of animals we will also evaluate whether the tail of the Beagles would also be feasible. In this respect, we would be able to have more experimental conditions or duplicates in each animal. The tail is being employed in the IVD field in rats and mice, where IVD degeneration is induced either by puncture of the tail or looping of the tail. In this respect, inducing disc degeneration by puncture in the tail of the dog would minimize suffering, given that the IVD is easily approached by a minimal invasive technique assisted by fluoroscopy. Nevertheless, one of the limitations of the "canine tail model" would be that the size of the IVDs is much smaller than the lumbar IVDs, and thereby determining all biochemical, biomolecular and histological parameters in each IVD (as described under the 3R section for the lumbar IVDs) would not be feasible.

---

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one week post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications. Furthermore, animals are given toys as enrichment and are allowed to be for at least one hour outside their wards in order to play. Furthermore, animals are often examined by the researcher, which does not cause any pain but is seen as enrichment.

---

## Repetition and duplication

### E. Repetition

---

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

Not applicable

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

No

---

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

Occasionally wound healing may be delayed; in that case the dog may have to be housed solitary for a short period of time.

Explain why these effects may emerge.

Animals are given an Elisabethian collar after IVD degeneration is induced, that is a plastic collar attached around their neck and is extending further than their mouth. In this way one can prevent them from licking their wound, but certain dogs have proven to be very inventive and still manage to get to their wound.

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

proper suture techniques will be applied (subcutaneous sutures will prevent wound dehiscence)

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

If general clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized. Clinical signs related to the animal model may include: paraparesis, paralysis, unilateral lameness of the hind limb, proprioceptive disorders, urinary incontinence. These neurologic signs are related to herniation of the IVD and can vary dependent on the location of the herniation. Humane endpoints include: acute paralysis. In case of the other neurologic signs, they are considered a humane endpoint when the neurologic status of the dog is not improving after initiation of proper treatment that primarily consists of anti-inflammatory medication and if needed decompressive surgery of the allocated IVDs. In the latter, the decompressed IVDs will be excluded from the study, while the other IVDs and the allocated treatment group can be followed up until termination of the experiment.

Indicate the likely incidence.

We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints

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

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

moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect post-mortem information that is very important in order to define the effect of the regenerative treatment and also understand the underlying mechanism of action

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

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

Yes



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

1. Aanvraagnummer : 2015.II.813.023
2. Titel van het project : Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration
3. Titel van de NTS : Nieuwe behandelingen voor chronische rugpijn

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 26-06-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 13-07-2016 en 26-08-2015  
 anderszins behandeld: per email 10-09-2015  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 16-07-2015 tot 12-08-2015 en  
03-09-2015 tot 09-09-2015 en  
30-09-2015 tot 01-10-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 12-10-2015

#### 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 26-08-2015
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: Aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen:  
De hond is doeldier met mogelijke translatie naar de mens. Alleen het lijkt wel alsof er nu al geld is voor het humane onderzoek en dat het onderzoek van de hond later pas gefinancierd gaat worden als het onderzoek bij de mens succesvol is. Moet het onderzoek dan niet herschreven worden naar de mens?
- Strekking van het (de) antwoord(en):  
Weergave presentatie onderzoeker:

De onderzoekster presenteerde haar project en ging in op de vragen die haar voorafgaand aan het project waren toegestuurd (zie daarvoor vraag A8). Additioneel kwamen de volgende punten aan de orde.

Het klopt dat bedrijven in eerste instantie alleen geïnteresseerd zijn in de patiëntenkliniek, als dat werkt dan is de farmacie ook geïnteresseerd in de hond. Maar het onderzoek is voor honden en mensen bedoeld want zij hebben beiden last van rugklachten. Ter indicatie 70/85 procent van de mensen krijgt rugklachten en het is nummer 1 van klachten in het dagelijks leven. Veel honden hebben ook last van rugklachten en 1 op de 3 honden die een hernia ontwikkelt overlijdt daar aan. Honden die zwaar werk leveren zoals politiehonden en hulphonden hebben 50 procent meer kans om rugklachten te ontwikkelen. Het is maatschappelijk voor de mens en de hond een zeer belangrijk onderwerp. Daarnaast is de hond ook een goed model voor de mens omdat hij niet alleen klinisch dezelfde klachten laat zien, maar ook biochemisch, biomoleculair, radiologisch en fysiologisch. Het model is afgelopen jaren geheel in kaart gebracht en gevalideerd met de hond en daarbij komt dus dat de hond ook doeldier is.

De strategie waar het om draait zijn de stamcellen. Vanwege degeneratie moeten er meer cellen komen tussen de wervels die gedegeneerd zijn. Er wordt gewerkt met stamcelinjecties, zo kan er in een vroeg stadium behandeld worden waardoor een operatie hopelijk voorkomen kan worden.

Waarom worden honden gebruikt? Met name voor het onderzoek naar nieuwe behandelingsmethoden hetgeen goed mogelijk is in de hond. Bij honden met korte poten is al heel vroeg discus degeneratie aanwezig. Op de leeftijd van drie jaar vertonen deze dieren al klinische klachten. Bij honden met lange poten is discus degeneratie pas op latere leeftijd waarneembaar. Ze vertonen vooral klachten in de lage rug en de nek, hetgeen ook bij de mens het geval is.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 16-07-2015, 03-09-2015 en 30-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: De DEC vraagt zich af of dit project zich met name richt op de hond als doeldier of dat het onderzoek met name voor de mens bedoeld is. Graag toelichten. Mocht u zich met name op de mens richten, dan verzoekt de DEC u toe te lichten waarom u in dit onderzoek specifiek voor de hond hebt gekozen en niet voor konijn, rat of muis. De DEC verzoekt u dit ook op te nemen in de NTS.
- 3.1, achtergrond: De DEC mist informatie over de stand van zaken op dit gebied wereldwijd, resultaten van uw eigen voorgaande onderzoek en een korte weergave van

relevante literatuur (niet verwerkt in een bijlage). Graag toelichten en benoemen of u een systematic review hebt uitgevoerd.

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u de informatie over caveolin-1 op te nemen in de achtergrond.
- 3.2 doel: U heeft het bij punt 1 over een 'three-stage approach', maar u noemt er uiteindelijk maar twee. Graag verhelderen.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u dit stuk in te korten, waarbij u let op de leesbaarheid en niet teveel herhaalt. De DEC verzoekt u de hoofddoelen uiteen te zetten per punt en u te beperken tot het overall design. Graag herschrijven.
- 3.4, onderzoeksstrategie: Bij 3.4.4 klopt de nummering van de type dierproeven niet. Graag wijzigen.

Bijlagen:

- De volgorde van de bijlagen wekt verwarring, want bijlage 4 wordt voor bijlage 3 uitgevoerd. Graag wijzigen.

- Datum: 03-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel:

- De DEC adviseert om kort aandacht te besteden aan wat precies validatie in vitro inhoudt en hoe nieuwe targets worden geïdentificeerd. Voorts adviseert de DEC het gebruik van honden nader aan te scherpen en te motiveren, met name met betrekking tot het zoeken van nieuwe behandelingsmethoden voor lage rugpijn.

- Datum: 30-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

- In bijlage 3 vraagt u vrouwelijke ratten aan, maar de motivatie daarvoor is onvoldoende. Graag nader motiveren.
- In bijlage 4 het gebruik van vrouwelijke of mannelijke honden graag nader motiveren.

- Datum antwoord: 12-08-2015

- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel:

- Dit project richt zich op de hond en de mens aangezien beiden last kunnen hebben van discusdegeneratie en inherent rugpijn (zoals ook in de NTS beschreven staat). Modellen zoals de rat, konijn of muis hebben een translatiestap nodig voordat resultaten naar de hond en mens vertaald kunnen worden. Aangezien de hond een doel dier is, is gekozen om met de hond te werken als experimenteel dier voor de laatste translatiestap naar de honden/humane patiënt.
- In de aangepaste versie van de aanvraag is er aanvullende informatie opgenomen in de achtergrondsectie. [REDACTED] een systematische review uitgevoerd specifiek voor de hond (Bach FC, Willems N, Penning LC, Ito K, Meij BP, Tryfonidou MA (2014)



Potential regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration in dogs. BMC Vet Res 10: 3-6148-10-3.) en voor de mens in samenwerking met internationale partners actief op het gebied van regeneratieve behandelingen van tussenwervelschijf regeneratie ██████████

(2014) A systematic review of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells for disc degeneration: insights and future directions for regenerative therapeutics. Stem Cells Dev 23: 2553-2567.) Een volledige weergave van de literatuur is opgenomen in de appendix.

- De aanvullende informatie over caveolin-1 is toegevoegd aan de achtergrond. Tevens is aanvullende achtergrondinformatie betreffende andere actieve stoffen (zoals Link-N) en stamcellen nu opgenomen in het voorstel. Hiermee wordt de strategiesectie korter en bondiger, zoals de DEC commissie voorstelt.
- Stap 3 wordt nu toegelicht in de aangepaste versie. In de derde stap wordt een vertaling gemaakt naar primaire cellen geïsoleerd uit degenererende tussenwervelschijven van beide species (hond en mens).
- Dit is aangepast in het onderzoeksvoorstel zoals voorgesteld. Gedetailleerde onderbouwing betreffende het dier en model worden verder behandeld in de aangewezen dierprocedures.

Bijlagen:

- Dit is aangepast in het onderzoeksvoorstel.

- Datum antwoord: 09-09-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel:

- *De DEC adviseert om kort aandacht te besteden aan wat precies validatie in vitro inhoudt en hoe nieuwe targets worden geïdentificeerd.*

The in vitro validation and target identification has been revised in order to address this as follows in section 3.4.2 under Key objective 1: "Approach: A three-stage approach will be set up in order to narrow down the targets derived from "-omics" studies, with focus on matrix production and inflammation control, and reduce the number of animals employed. The first stage is animal-free and employs an established cartilage cell line, the ATDC5. ██████████ ATDC5 are retrovirally transduced with a vector encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) driven by the human collagen type 2 promoter to monitor chondrogenesis. Given eicosanoids formed via the cyclooxygenase (COX) pathways are major players in various inflammatory and degenerative disorders, COX-2 activity will be determined by a colorimetric method after initial stimulation by a range of TNF · /IL1 concentrations. A subset of the targets will be studied in the second stage in primary chondrocytes isolated from transgenic mice harboring a fluorescent reporter based on collagen 2. (██████████) These mice enable isolation of a pure population of proliferating chondrocytes. In this in vitro model

chondrogenesis and inflammation control will be studied in micro-aggregates in the presence of the selected library of peptides and/or miRNAs based on the observed biologic effects in stage 1. The most promising targets will be functionally studied/validated in the third animal-free stage over a longer period of time in a 3D-culture. Herein primary human and canine CLCs isolated from degenerated discs readily available through the Biobank will be used, as a last translational step towards the follow up in vivo studies. Transcription factor-miRNA-target gene networks associated with IVD health will help determine miRNA master regulators that will be validated by mechanistic miRNA studies."

- *Voorts adviseert de DEC het gebruik van honden nader aan te scherpen en te motiveren, met name met betrekking tot het zoeken van nieuwe behandelingsmethoden voor lage rugpijn.*

The social relevance of this project addresses both the human and veterinary aspect. In order to improve this further the point raised by the DEC has been addressed by including additional information on the clinical impact of IVD disease in both canine and human patients which is now included in the Background section as follows:

"The project focuses on developing treatment strategies for neck and back pain of canine and human patients in close collaboration with academia from the medical and bioengineering field.

Low back pain in humans has been identified as one out of seven high-burden conditions by the 2013 Report Priority Medicines for Europe and the World. (Kaplan et al., 2013) It is the most common type of pain restricting daily activity in EU citizens (Eurobarometer, 2007) and entails the largest number of years lived with disability. (Hoy et al., 2014) Neck and back pain are strongly related to intervertebral disc (IVD) degeneration (Cheung et al., 2009). Like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration with similar characteristics and clinical signs (Meij and Bergknut, 2010a). Owners of dogs may report unilateral or bilateral lameness or paresis/paralysis, toe dragging, low tail or neck carriage, difficulties with rising, sitting or lying down, reluctance to jump or climb, urinary or faecal incontinence, and hyperesthesia or self-mutilation [REDACTED] In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs [REDACTED] Given that, not only on a clinical levels, but also on a histological, biochemical, and radiological level IVD degeneration in canines is similar to human, the dog is considered to be a suitable animal model for human IVD degeneration [REDACTED] As such, this project employs experimental dogs as a last step to translate new treatment strategies towards canine and human patients with IVD disease."

Furthermore, in the Appendix-description animal procedure no 4, the justification of the choice to use the dog as an animal model now also addresses the clinical relevance of IVD disease in the canine population. This project will study new treatment strategies for both the canine and human patients with IVD disease. This is done as follows: "The canine species is considered to be a suitable model to study the process of IVD

degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans. ( ) Owners of dogs with IVD disease may report unilateral or bilateral lameness or paresis/paralysis, toe dragging, low tail or neck carriage, difficulties with rising, sitting or lying down, reluctance to jump or climb, urinary or faecal incontinence, and hyperesthesia or self-mutilation ( ) In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs ( ) As such, the experimental animal model used in this animal procedure serves as a last step to translate new treatment strategies towards canine and human patients with IVD disease."

The "niet-technische samenvatting" has been adjusted accordingly.

- Datum antwoord: 01-10-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

In bijlage 3 is in overleg met de IvD de onderbouwing voor het gebruik van vrouwelijke dieren verder toegelicht als volgt:

Rats at the age of 12-14 weeks are being employed in the study so that they have reached skeletal maturity and the problems of IVD remodeling due to skeletal growth can be eliminated. We prefer to use ( ) rats, since ( ) rats are known to continue with growing at even later ages than ( ) rats and can hence influence IVD remodeling, can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up. Furthermore, in studies where we want to determine the fate of mesenchymal stem cells after intra-discal application, tracking of ( ) DNA can be done by means of ( ) on the ( ) ( ) "Specific" ( ) genes are not available for this procedure and thereby only the combination of ( ) rat recipient and ( ) mesenchymal stem cell donor is feasible for these studies. Gender is expected not to influence the study. No effects have been described of progesterone on regeneration of tissue by NP cells and only two studies mention that estradiol can protect against induced cell death. As this is very limited and restricted to artificially induced cell death, and in human nor canine patients a connection between gender and disc degeneration was found, also at menopausal age, it is very unlikely that any effect of cycle will be evident.

Verder is bijlage 4 voor wat betreft de onderbouwing van gebruik van vrouwelijke of mannelijke honden ook aangescherpt als volgt:

Regarding the sex of animals: There is very limited evidence with regard to the role of gender in experimental dogs and its possible effects on IVD degeneration primarily because this has not been consistently studied in the literature. In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients ( ) hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predilection also for the human population of

patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011). In short term studies (range of 3 months) we aim at having a sex ratio of 1:1 in the study cohort in order to have both sexes represented in the study. In long term studies of > 6 months, we preferably work with [REDACTED] dogs in order not to have issues with the cyclus of [REDACTED] dogs. [REDACTED] dogs have twice a year an oestrus cycle and when not used for breeding castration is advised in order to diminish the risk for development of breast cancer and other complications of irregularities of the cycle, including pseudopregnancy and pyometras, and accidental fertilisation cannot be excluded during long term housing of the animals. For this reason, [REDACTED] dogs when not used for breeding should be sterilised, which would add another experimental procedure with moderate severity. Specifically for studies where we want to track the fate of transplanted MSCs after a long term follow up, we need to work with [REDACTED] Beagle dogs that receive [REDACTED] MSCs during the transplantation procedure and thereby enables tracking [REDACTED] MSCs by means of the [REDACTED]

#### References:

- Siemionow et al. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. Spine (Phila Pa 1976). 2011 Aug 1; 36(17): 1333–1339.

- [REDACTED]

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

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

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

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.

- uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmethoden voor discus degeneratie (IVD) bij mens en hond. Het onderzoek naar nieuwe middelen steunt op fundamenteel onderzoek naar de biochemische factoren in de normale ontwikkeling van de discus (zie bijvoorbeeld het onderzoek naar de rol van caveolin-1). De behandeling van patiënten met chronische rugpijn bestaat in eerste instantie uit het slikken van pijnstillers. Wanneer deze niet meer werken is de enige optie nog een operatie, waarbij de discus wordt vervangen of weggehaald, en waardoor de wervels aan elkaar groeien. Deze operaties gaan gepaard met een lange herstelperiode en in veel gevallen herstelt de patiënt niet volledig. Beter zou het zijn om een operatie te voorkomen en slijtage van de rug in een vroeg stadium te behandelen. Door middel van deze deels fundamentele en deels translationele studie kan men op zoek gaan naar nieuwe factoren die een belangrijke rol spelen in de slijtage en het herstel van de versleten discus en dit vervolgens vertalen naar mogelijke behandelingen bij ratten en honden (experimentele dieren) voordat ze kunnen worden toegepast bij de patiënt (mens en hond).
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. 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)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief in de bijlagen als gevolg van de (be)handelingen in de bijlage varieert van licht tot

matig ongerief. In bijlagen 1 en 2 is het ongerief licht vanwege het euthanaseren van de dieren. In bijlage 3 is het ongerief eveneens ingeschat als licht als gevolg van het induceren van IVD in de staart onder narcose, het onder anesthesie toedienen van biomaterialen of MSC's en het euthanaseren van de dieren. In bijlage 4 is het cumulatieve ongerief matig als gevolg van het induceren van degeneratie van de tussenwervelschijf onder narcose, het meerdere malen onder narcose onderzoeken van de dieren en het maken van MRI's, het uitvoeren van een nucleotomy onder narcose, het onder anesthesie toedienen van biomaterialen of MSC's en het euthanaseren van de dieren. De DEC is van mening dat deze ongeriefinschattingen realistisch zijn.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In het fundamentele deel (bijlagen 1 en 2) van dit project wordt onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van de discus en de rol van specifieke eiwitten. Hiervoor worden in bijlage 1 cellijnen opgezet, maar hiervoor is materiaal afkomstig van muizen nodig. In bijlage 2 wordt de rol van caveolin-1 in IVD fysiologie en IVD degeneratie onderzocht en omdat Caveolin-1 een weefsel- en context-afhankelijke effect heeft, kunnen in vivo studies met deze muizen niet worden vervangen door in vitro experimenten. De translationele studies in bijlagen 3 en 4 kunnen niet worden vervangen door in vitro modellen of weefselkweken aangezien hier de behandelingsstrategieën getest worden in ziektemodellen waarbij meerdere signaalroutes/biochemische cascades zijn aangetast. Ten behoeve van de translatie is het bovendien vereist dat deze nieuwe behandeling getest wordt op proefdieren, eerst in kleine proefdieren, daarna op grote proefdieren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. In het fundamentele onderzoek wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van surplus dieren uit ander onderzoek en worden verfijnde laboratoriumtechnieken toegepast, waarmee per dier meer kennis verkregen kan worden. Voor wat betreft de dieren die benodigd zijn in bijlage 2 wordt samengewerkt met een andere onderzoeksgroep die dezelfde muizenstam gebruikt voor onderzoek naar lever lipidose en regeneratie. Daarnaast worden, indien mogelijk, meerdere discussen per dier gebruikt i.p.v. slechts één discus, waardoor er minder dieren nodig zijn. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren zijn, in bijlagen 3 en 4, statistische methoden toegepast en wordt gebruik gemaakt van een randomized block design. In bijlage 3 kunnen maximaal 5 staart IVD's behandeld worden in één experimentele rat, wat inhoudt dat tot 5 behandelingsgroepen kunnen worden geïncorporeerd in een randomized block design. In bijlage 3 zullen vrouwelijke ratten gebruikt worden omdat mannelijke ratten ook na de leeftijd van 12-14 weken nog door groeien, wat van invloed is op de IVD 'remodelling'. Daarnaast is in de experimenten waarbij MSC's worden toegediend DNA van dieren van het andere geslacht nodig zodat het DNA gevolgd kan worden. Aangezien er geen DNA van vrouwelijke ratten beschikbaar is, zal DNA van mannelijke ratten gebruikt worden en zijn dus vrouwelijke ratten noodzakelijk. In bijlage 4 zullen voor de korte termijn studies (<3 maanden) vrouwelijke en mannelijke honden gebruikt worden. Voor de lange termijn studies (>6

maanden) worden mannelijke honden gebruikt vanwege de cyclus van vrouwelijke honden. Daarnaast wordt geadviseerd om vrouwelijke honden te steriliseren om de kans op borstkanker en andere onregelmatigheden van de cyclus te verkleinen, wat een extra experimentele handeling met matig ongerief betekend. Om in bijlage 4 het aantal benodigde dieren te verminderen zal ook gekeken worden of het mogelijk is IVD in de staart van de hond te induceren. Hierdoor wordt het aantal experimentele condities of duplicaten per dier verhoogd en zullen minder dieren nodig zijn. Nadeel hiervan is wel dat de omvang van de IVD kleiner is waardoor niet alle biochemische, histologische en biomoleculaire parameters bepaald kunnen worden. Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er zullen adequate humane eindpunten worden toegepast en vanwege de aard van de experimenten zal in bijlagen 3 en 4 ook adequate pijnbestrijding worden toegepast. Indien in bijlage 4 bij de honden ook IVD in de staart wordt geïnduceerd, zal dat leiden tot verfijning, aangezien IVD in de staart een minimaal invasieve techniek is. De ratio voor het gebruik van muizen in bijlagen 1 en 2 is gelegen in het voorbereidende (bijlage 1) en fundamentele (bijlage 2) onderzoek naar de bijvoorbeeld de rol van caveolin-1. Omdat met ratten veel ervaring is in onderzoek naar discus degeneratie zullen deze in bijlage 3 worden gebruikt om de nieuwe behandelingen voor discus degeneratie verder te testen. In bijlage 4 zullen honden gebruikt worden voor het verdere onderzoek naar discus degeneratie. Ook met honden is veel ervaring in onderzoek naar discus degeneratie. Daarnaast dient de hond als 'doeldier' omdat discus degeneratie ook bij honden optreedt en deze vorm van slijtage vergelijkbaar is met de slijtage zoals die bij mensen voorkomt.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmethoden voor discus degeneratie bij mens en hond, substantieel is.

Ten gevolge van de inductie van IVD in de rug en de staart treedt bij een aanzienlijk deel van de dieren licht tot matig ongerief op, maar de DEC is van mening dat voor de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de verschillende (be)handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel.

Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is nog niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren, en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar.

De onderzoekers hebben goed beargumenteerd waarom zij in dit onderzoek alleen vrouwelijke ratten en vrouwelijke dan wel mannelijke honden willen gebruiken. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het ten hoogste matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015285

**Bijlagen**

2

Datum 20 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015285. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2015  
Geplande einddatum: 30 augustus 2020  
Titel project: Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration  
Titel niet-technische samenvatting: Regeneratieve behandelingen voor chronische rugpijn  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.n

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Ut  
Datum: 19 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015285

**Bijlagen**

2

Datum 20 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 20 oktober 2015

Vervaldatum: 19 november 2015

Factuurnummer: 15700285

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015285	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT  
3501AA12007

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015285

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 20-11-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

**Datum**  
20-11-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015285

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

### **Ondertekening**

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

### **Leges**

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

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

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

### **Wanneer een beslissing**

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

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post





## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT  
3501AA12007

Centrale Commissie  
Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD108002015285

Uw referentie

Datum 20-11-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Bijlagen

Datum  
20-11-2015  
Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD108002015285

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

#### Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

#### Leges

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

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

#### Opsturen binnen veertien dagen

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

#### Wanneer een beslissing

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

#### Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

#### Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Utrecht, 23 november 2015

Geachte leden van de Centrale Commissie voor Dierproeven,

Op 23 november 2015 hebben wij uw response op een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. In uw brief bleek nadere toelichting nodig te zijn op enkele inhoudelijke onduidelijkheden. In de bijlage treft u puntsgewijs de toelichting op de vragen die de CCD gesteld heeft. Hierin worden ook de bijbehorende wijzigingen in de formulieren aangegeven met rode tekst. Tevens zijn de gewijzigde documenten van de aanvraag bijgesloten.

We hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en dat u tot een positief advies kunt komen over dit project.

Vriendelijke groeten,

████████████████████

---

Puntsgewijs response of vragen van de CCD tav AVD 108002015285

---

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

De ontbrekende informatie is nu ingevuld in de bijgewerkte documenten.

Proef 1: 0%

Proef 2: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease. Mice employed for breeding are used for the period of max 24 weeks of age, in this time frame the likely incidence for a humane endpoint is 5%.

Proef 3: literature does not report specific complications to this animal model and contact with researchers employing the model did not indicate that this is likely to happen. The likely incidence is estimated at 2%.

Proef 4: We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. The likely incidence is estimated at 2%.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Het betreft een established muizen zijn (GG2939) die sinds 2008 onderhouden wordt. Fokken brengt geen ongerief met zich mee.

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Inderdaad dieren overlijden plotseling en voorafgaand worden geen klinische verschijnselen waargenomen (dit wordt benoemt in het aanvraag als volgt: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.) De klinische problematiek speelt zich met name in de periode na de 27 weken leeftijd. Echter, de fokdieren worden maximaal tot de leeftijd van 6 maanden ingezet en fokken brengt geen ongerief met zich mee, voor zo wel de caveolin-1 KO muizen (GG2642) en de WT-muizen op het zelfde genetische achtergrond (lijn 100903). Zowel het GDL als de IvD kunnen dit bevestigen. Beide lijnen worden al jaren onderhouden bij de SPG afdeling van het GDL te Utrecht.

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

Inderdaad bij proef 3 en 4 zijn experimenten gepland waarbij we het (additive) effect van stamcellen willen onderzoeken en willen weten wat de rol van de stamcellen is in de behandeling van discusslijtage. Door mannelijke stam cellen te gebruiken kunnen we (zonder verdere modificaties die mogelijk invloed hebben op het gedrag van de cellen) de cellen traceren na afloop van het experiment.

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

We denken dat er sprake is van een misverstand. De aanvraag is ondertekend door de portefeuillehouder van de UU, prof.dr. A. Pijpers. Dit is de juiste persoon. Inmiddels is hierover telefonisch contact opgenomen met het ondersteunend bureau. Tijdens dat contact kon door de secretaresse worden bevestigd dat de ondertekening juist was. Derhalve is er niet een nieuw ondertekend aanvraag toegevoegd bij de beantwoording van deze vragen.

Leges

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

De leges bleken inderdaad niet betaald. De reden hiervoor is dat de factuur, anders dan de factuur voor projectaanvraag 108002015282 (afkomstig van dezelfde onderzoekster en tegelijkertijd ingediend), niet naar het juiste adres was verstuurd. Daardoor was de factuur niet bij de financiële afdeling terecht gekomen. Ook hierover is inmiddels telefonisch contact geweest met de CCD. Er is op 24 november jl. een nieuwe factuur verstuurd. De betaling wordt zo snel mogelijk uitgevoerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015285  
**Bijlagen**

1

**17 DEC. 2015**

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Prof. dr. Pijpers,

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 30 augustus 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 12 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op artikel 10 a1 van de Wod worden twee algemene voorwaarden toegevoegd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

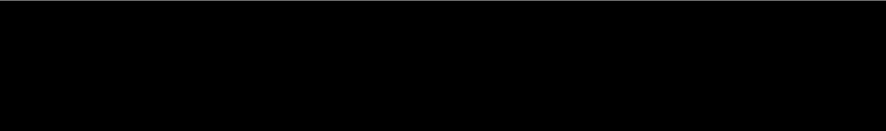
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

## **Projectvergunning**

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 30 augustus 2020, voor het project

"Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De startdatum wijkt af van de aangevraagde datum omdat deze in het verleden ligt. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is UD1.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 oktober 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 oktober 2015;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 oktober 2015, ontvangen op 19 oktober 2015.



Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Isolation of primary pd2EGFP+ chondrocytes from Col2-pd2EGFP reporter mice	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrech	80	Licht / mild	transgene muizen
2: Studying the IVD phenotype of Caveolin-1 KO mice	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Caveolin-1 KO en WT muizen	230	Licht / mild	transgene muizen
3: Rat model with induced IVD degeneration	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Sprague Dawley rats	50	Licht / mild	nvt
4: Canine model of IVD degeneration (mild and severe degeneration)	Honden ( <i>Canis familiaris</i> ) / beagle	25	Matig / moderate	nvt

#### Voorwaarden

##### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

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

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

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

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

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

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

#### **Levensloopdossier**

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 17 december 2015 16:17  
**Aan:** 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** uitslag AVD2015285

Geachte DEC Utrecht,  
Wij hebben vandaag een beschikking verstuurd voor aanvraag AVD2015285. Met jullie referentienummer 2015.II.813.023. De aanvraag is in zijn geheel vergund zoals aangevraagd. Er zijn een aantal vragen gesteld en beantwoord. Deze zijn hieronder weergegeven.

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

De ontbrekende informatie is nu ingevuld in de bijgewerkte documenten.

**Proef 1:** 0%

**Proef 2:** Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease. Mice employed for breeding are used for the period of max 24 weeks of age, in this time frame the likely incidence for a humane endpoint is 5%.

**Proef 3:** literature does not report specific complications to this animal model and contact with researchers employing the model did not indicate that this is likely to happen. The likely incidence is estimated at 2%.

**Proef 4:** We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. The likely incidence is estimated at 2%.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Het betreft een established muizen zijn (GG2939) die sinds 2008 onderhouden wordt. Fokken brengt geen ongerief met zich mee.

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Inderdaad dieren overlijden plotseling en voorafgaand worden geen klinische verschijnselen waargenomen (dit wordt benoemt in het aanvraag als volgt: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.) De klinische problematiek speelt zich met name in de periode na de 27 weken leeftijd. Echter, de fokdieren worden maximaal tot de leeftijd van 6 maanden ingezet en fokken brengt geen ongerief met zich mee, voor zo wel de caveolin-1 KO muizen (GG2642) en de WT-muizen op het zelfde genetische achtergrond (lijn 100903). Zowel het GDL als de IvD kunnen dit bevestigen. Beide lijnen worden al jaren onderhouden bij de SPG afdeling van het GDL te Utrecht.

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

Inderdaad bij proef 3 en 4 zijn experimenten gepland waarbij we het (additive) effect van stamcellen willen onderzoeken en willen weten wat de rol van de stamcellen is in de behandeling van discusslijtage. Door mannelijke stam cellen te gebruiken kunnen we (zonder verdere modificaties die mogelijk invloed hebben op het gedrag van de cellen) de cellen traceren na afloop van het experiment.

**Ondertekening**

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

We denken dat er sprake is van een misverstand. De aanvraag is ondertekend door de portefeuillehouder van de UU, prof.dr. A. Pijpers. Dit is de juiste persoon. Inmiddels is hierover telefonisch contact opgenomen met het ondersteunend bureau. Tijdens dat contact kon door de secretaresse worden bevestigd dat de ondertekening juist was. Derhalve is er niet een nieuw ondertekend aanvraag toegevoegd bij de beantwoording van deze vragen.

**Leges**

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

De leges bleken inderdaad niet betaald. De reden hiervoor is dat de factuur, anders dan de factuur voor projectaanvraag 108002015282 (afkomstig van dezelfde onderzoekster en tegelijkertijd ingediend), niet naar het juiste adres was verstuurd. Daardoor was de factuur niet bij de financiële afdeling terecht gekomen. Ook hierover is inmiddels telefonisch contact geweest met de CCD. Er is op 24 november jl. een nieuwe factuur verstuurd. De betaling wordt zo snel mogelijk uitgevoerd.

Met vriendelijke groet,

██████████

Inventaris Wob-verzoek W16-10S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015286</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag 1				x		x		
10	Reactie aanvulling aanvraag 1				x		x	x	
11	Verzoek aanvulling aanvraag 2				x		x		
12	Reactie aanvulling aanvraag 2				x		x		
13	Aanvullende informatie DEC				x		x		
14	Projectvoorstel herzien				x		x	x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud 2			x					
16	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x			x	
17	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien			x					
18	Niet-technische samenvatting herzien	x		x					
19	Advies CCD		x						x
20	Beschikking en vergunning				x		x		



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 2015 286 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	1179037
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	A.Deusinglaan 1, [REDACTED]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713AV Groningen
		IBAN	NL80ABNA0446049352
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de 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]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 10 - 2015 |
| Einddatum  | 30 - 9 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC-RuG   |
| Postadres   | Antonius Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713AV Groningen |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl                                |



## 4 Betaalgegevens

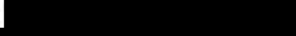
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*


## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

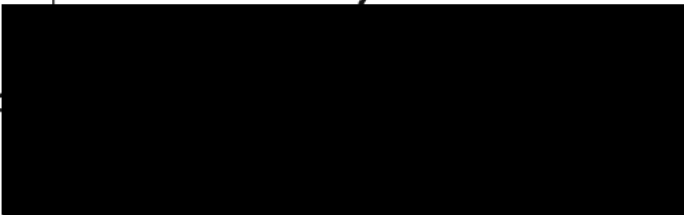
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende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

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 15-10-2015

Handtekening 



## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

**Hematopoietic stem cells.** Most, if not all, tissues in our body contain a small population of stem cells that are essential to remain cellular homeostasis. The frequency and functional activity of these tissue-resident stem cells varies substantially from tissue to tissue. Arguably the best-characterized adult stem

cells are hematopoietic stem cells (HSC) that are normally located in the bone marrow and play an essential role in replenishing all the differentiated blood cell compartments. Although the various mature blood cell types, which include erythrocytes, granulocytes, platelets, macrophages and B- and T-lymphocytes, are morphologically and functionally highly distinct, they are all produced by the same population of HSCs. Seminal experimental transplantation studies in mice have proven that a single HSC is able to restore all blood cell types. The first experimental bone marrow transplantations were carried out in the mid 1950's, and the existence of HSCs was formally proven in the early 1960's. As such, it is safe to consider that HSCs are the founding fathers, or rather mothers, of the field of adult stem cell biology.

Clinical relevance of hematopoietic stem cells. After HSCs were first discovered, it did not take very long to realize their potential clinical relevance, and indeed the first bone marrow transplantations in patients with leukemia were carried out in the 1960's, leading to the Nobel Prize for E. Donnall Thomas in 1990. The clinical use of HSCs has been on the increase ever since. Beyond "classical" bone marrow transplantations, HSCs can now be isolated from cord blood and can be used as carriers for transgenes to treat various genetic deficiencies. Multiple exciting research programs are underway to assess whether it will be possible to generate, in vitro, functional mature blood cells (erythrocytes, platelets) from HSCs, to be used for transfusion/infusion purposes. In addition, lymphoid progeny of HSCs can possibly be used in immune therapy protocols. One very recent avenue of HSC research explores whether it may be possible to generate transplantable HSCs from non-stem cells. Therefore, although the field of HSC biology started in the mid 1950's, the full potential of using and manipulating these rare cells has been far from reached.

Stem cell ageing. Hematopoietic stem cells, as all adult, tissue-resident stem cells, ensure lifelong homeostasis. HSCs replenish blood cells that are lost as a result of trauma/bleeding, but more typically as a result of their age. The lifespan of individual blood cells ranges from several days (granulocytes) to months (erythrocytes) or years (memory B- cells), and mature blood cell compartments must therefore be constantly replenished from more primitive stem- and progenitor cell compartments. Therefore, stem cells can be considered as nature's (or the organism's) own anti-ageing agents; without the continuous, lifelong activity of stem cells, tissues would rapidly and prematurely degenerate. The converse corollary implies that protecting stem cells from the deleterious effects of ageing could contribute to an increased potential to maintain tissue homeostasis during the lifespan of an organism.

As pointed out above, HSCs are arguably the best understood stem cells, and consequently, of all adult stem cell types we have learned most about stem cell ageing in the field of hematology. From a clinical perspective, most patients with hematological conditions are elderly subjects. This holds true for patients suffering from a shortage of blood cells types (anemias, neutropenias, thrombopenias) as well as patients suffering from an excess of blood cells (myeloproliferative syndromes, chronic and acute leukemias). The increased incidence of hematological conditions with advanced age suggests that they may be originating from dysfunctional HSCs, in which the balance between selfrenewal and differentiation has become impaired.

Early serial transplantation studies in the field of HSC ageing have shown that the functional lifespan of HSCs exceeds the lifespan of the original donor mouse. Multiple studies, including our own, documented that, counter-intuitively, with age hematopoietic stem cells increase in number in the mouse. However, we showed that the functional activity of aged HSCs decreases substantially compared to their young counterparts (1). This is evident from single cell transplantation studies, but we also showed, using virally barcoded HSCs, that the clone size of aged HSCs is much smaller than that of young HSCs (2). Serial transplantation studies have documented that aged HSCs have reduced selfrenewal capacity, and display a preference for producing myeloid cells at the expense of lymphoid cells (aged HSCs become myeloid-biased or rather lymphoid-deficient) (reviewed in 3). Several lines of evidence indicate that in elderly humans fewer HSC clones contribute to hematopoiesis compared to young adults, suggesting exhaustion of many HSCs, and clonal dominance of some. Interestingly, very recent data indicate that such clonal dominance may arise from mutations in important 'selfrenewing' genes that confer a proliferative advantage to these cells. These potentially preleukemic cells may then in a time frame of many years, if not decades, accumulate additional mutations before they fully derail and become acutely leukemic. Interestingly, from large-scale sequencing efforts it is now evident that common preleukemic events very often involve genes that can be considered as epigenetic modifiers. Examples include DNMT3a, ID2, ASXL, and EZH2. In fact, my lab was the first to show that Ezh2 plays an important role in murine HSCs selfrenewal, and extends their functional lifespan (4). At the same time, however, it should also be realized that the (stem cell) ageing process is under genetic control. Whereas in experimental

hematology studies C57BL/6 mice are used in >95% of all cases (simply because many transgenic-, reporter-, and congenic strains exist in this background) it is very clear that hematopoiesis in other regular inbred strains of mice is often very different (5,6). Obviously, the same holds true for humans, where the genetic variation is even more diverse than in laboratory mouse strains. The natural genetic variation that is present in the many regular inbred strains that are available underlies impressive, but largely underexplored, physiological variability.

Although it is evident that hematopoietic stem cells lose functional activity during the ageing process, at present, the molecular mechanisms that contribute to hematopoietic stem cell ageing remain poorly understood.

References (from own work):



### 3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project is to identify and understand the molecular and cellular mechanisms that underly normal hematopoietic stem cell aging and its transformation towards leukemia. For this purpose we have established the following aims which we will address in the upcoming 5 years:

1. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?
2. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?
3. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?
4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?
5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

Our lab has 20+ years experience in experimental hematology, and has invested very substantially in the various technical approaches that are required to complete this research project. These include purification protocols of mouse hematopoietic stem cells (ref), single cell transplantations (ref), genetic (retro- or lentiviral) transductions of stem cells (ref), expansion of hematopoietic stem cells (ref), xenotransplantation of human normal and leukemic stem cells in immune-deficient recipients (ref), and transcriptome and epigenome profiling of limited numbers of stem cells (ref). Collectively, the availability

of this methodology ensures feasibility of the proposed studies.

### 3.3 Relevance

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

The population in many parts of the world, including the Netherlands, is gradually aging. Life expectancy has increased by ~40 years in the last 150 years, and all evidence suggests that a further increase will take place. Maintaining optimal stem cell functioning by preventing decline in their functioning, and may be even restoring stem cell potential in aged cells, will be of significant interest to combat and prevent age-related diseases. As most patients with hematopoietic failures are 65 years or older, the demographic changes in the developed world will lead to a very substantial increase in hematological patients seen in the Hospital. Understanding why hematopoietic stem cells decline in functionality in individuals with advanced age is essential to initiate efforts to design interventions aimed to improve stem cell functioning. Such interventions will consist of efforts to improve tissue homeostasis during ageing, prevent stem cell decline, and using stem cell therapies. The current research proposal aims to identify the molecular machinery that impacts on stem cell aging. Only if we understand how stem cells age, can we hope to begin designing anti-ageing intervention strategies.

### 3.4 Research strategy

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

The various subaims as specified in paragraph 3.2 will be pursued in parallel and not sequential subprojects, each carried out by different PhD students and postdocs, and supported by a permanent team of experienced research technicians. The research projects will be financed by different funding bodies, and are therefore relatively independent. Yet, the data obtained in the various subprojects are all addressing the fundamental question as to what makes hematopoietic stem cells age, and therefore methodology and results originating from one subproject will feed into other projects.

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

This proposal concerns 5 research questions, detailed below. The animal procedures, which are explained in detail in Appendix 1, 2, and 3, will be employed in all 5 research questions.

1. *what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?*

In this project we will isolate hematopoietic stem and progenitor cells from differentially aged mice, from distinct mouse strains. These cells will be characterized molecularly (RNA-Seq and Epi-Seq), and will be tested functionally in in vitro and in vivo experiments. To obtain stem and progenitor cells, donor mice will be aged and sacrificed at various timepoints. For functional testing, isolated cells will be transplanted in syngeneic or immune-deficient recipients, as explained in detail in Appendix 2. Often, these recipient mice will need to be properly conditioned by whole body irradiation. The fate of transplanted cells will then be monitored by assessing chimerism levels in blood, and at time of sacrifice in bone marrow, spleen, and thymus.

2. *can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?* In this project we will overexpress or repress/disrupt, candidate genes which we predict to alter hematopoietic stem cell behavior and assess the effect of such a genetic perturbation on stem cell functioning. In addition, we will culture stem cells in the presence of compounds predicted to alter their functioning and test this in appropriate in vitro and in vivo assays. Animal procedures in this project will include isolating stem cells from donor mice or human cord blood, genetically altering mice or cells using various genome-editing tools, transplanting genetically altered stem cells in recipients mice and monitoring chimerism levels in multiple tissues. Further details of the required animal procedures are explained in Appendix 2 and 3.

3. *how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?* In this project we will age mice from multiple distinct genotypes/strains, perform classical lifespan studies, and at specified timepoints

sacrifice otherwise unperturbed donor mice to collect stem cells, used for phenotyping at a molecular and functional level. Animal procedures are explained in Appendix 1, and will involve lifespan studies, and, as outlined above, hematopoietic stem cell transplantation.

4. *how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?* In this project we will assess how many stem cells contribute to blood cell formation after transplantation. For this purpose, hematopoietic stem cells will be isolated from donor mice or human cord blood, these cells will be lenti- or retrovirally transduced using vectors that are DNA barcoded (and in addition may or may not contain sequences encoding for genes of interest), after which transduced stem cells will be (xeno-) transplanted in properly conditioned recipients. Blood cell chimerism and barcode composition will be evaluated at various time points after transplant (Appendix 2). Upon termination of the experiment, mice are sacrificed to document barcode contribution in different cell types in various hematopoietic organs.

5. *how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?* Similar to the question as to how many stem cells contribute to normal blood cell development, we are also very much interested in how many leukemic stem cells maintain a tumor, ie how clonally diverse are cancer cells in one individual? In these studies we will barcode murine stem cells with a gene of interest, and similar as explained above, assess barcode composition upon transplanting modified cells in syngenic recipients. In addition, we will lentivirally barcode tumor cells from patients, and transplant these xenogeneically in immune deficient recipients. In all recipients chimerism levels will be assessed in blood at repeated time intervals, and at sacrifice in multiple hematopoietic organs (see Appendix 2 for more details).

These various subprojects will be pursued in parallel, and not sequentially. They will all include the same set of animal procedures (Appendix 1, 2, and 3), but the milestones for each project is separate, and milestones are not contingent upon each other. Yet, all projects contribute to the overall aim of the current application, namely to improve our understanding of what makes hematopoietic stem cells age.

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

All projects revolve around the central question as to how blood cell production is regulated and which are the genes that play a central role in this process. If we have found candidate stem cell genes, can we perturb/enhance functioning of hematopoietic stem cells by repressing or overexpressing these genes? Although the coherence between the various projects is therefore obvious, they will not be executed in a predetermined order.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Lifespan studies
2	Stem cell transplantation
3	Genereren nieuwe transgene muizenstammen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | bloedvormende stamcellen, veroudering, leukemie, stamceltransplantatie

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Bloedvormende (hematopoietische) stamcellen zorgen er voor dat gedurende ons leven alle verschillende typen bloedcellen in voldoende mate worden aangemaakt. Zij doen dit door zichzelf te vernieuwen en door uit te rijpen tot rode- of witte bloedcel of bloedplaatjes. Hoe het moleculaire proces van uitrijping en zelfvernieuwing van stamcellen verloopt is slechts zeer beperkt begrepen. Ontsporingen van dit proces kunnen leiden tot een tekort aan bloedcellen, hetgeen zich kan manifesteren als bloedarmoede of afgenomen afweer, of juist tot een overschot aan bloedcellen, culminerend in leukemie. Het doel van dit project is om te begrijpen hoe stamcellen op moleculair nivo de juiste keuzen maken om zich zelf te vernieuwen dan wel uit te rijpen, en hoe gedurende veroudering dit proces moeizamer verloopt.
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Een beter begrip in de mechanismen die ten grondslag liggen aan bloedcelvorming zal leiden tot een beter begrip omtrent het ontstaan van leukemieën, zal kunnen leiden tot methoden om stamcellen buiten het lichaam om te vermeerderen, zal kunnen leiden tot strategieën om stamcelveroudering te voorkomen of zelf om te keren, en maakt het mogelijk om verschillende typen uitgerijpte bloedcellen buiten het lichaam om te genereren. Gezamenlijk zal deze kennis patiënten die bloedziekten ontwikkelen ten goede komen.
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor dit onderzoek worden muizen gebruikt. Op grond van de omvang van onze onderzoeksactiviteiten in de afgelopen 5 jaar, verwachten wij in de komende 5 jaar ~1500 muizen per jaar te gebruiken. Het totaal aantal dieren zal dan 7500 zijn in de periode 2015-2020
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De meeste proefdieren zullen worden gebruikt als stamceldonor of stamcelontvanger. De eerste categorie dieren wordt, op verschillende leeftijden, getermineerd zonder enige verdere behandeling. De negatieve gevolgen voor het welzijn van deze stamceldonoren blijft derhalve erg beperkt. Stamcelontvangende proefdieren worden geconditioneerd met chemotherapie of bestraling om hun eigen bloedvormende systeem te vernietigen of te verzwakken. De negatieve gevolgen voor deze, vaak bestraalde, muizen zijn derhalve een tijdelijk verlies van lichaamsgewicht en een toegenomen ontvankelijkheid voor infectie (kort na bestraling, voortkomend uit tijdelijke verminderde bloedcelproductie). In sommige experimenten zullen stamcellen worden getransplanteerd waarin door middel van genetische manipulatie genen worden geactiveerd of juist onderdrukt. In voorkomende gevallen kan dit leiden tot leukemievorming. De negatieve gevolgen voor het welzijn van getransplanteerde dieren is over het algemeen gering tot matig, tenzij leukemie optreedt.
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Muizen: Gering 25%, matig 74%, ernstig 1%. Deze inschatting is gemaakt op grond van gegevens uit de afgelopen 5 jaar. Aangezien de aard van de in deze aanvraag voorgestelde experimenten niet wezenlijk afwijkt van die van de voorgaande jaren voorzien wij geen verschuiving in deze verdeling.
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	dieren worden gedood in het kader/na afloop van de proef



## 4 Drie V's

- 4.1 Vervanging  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- De functie van bloedvormende stamcellen kan slechts worden vastgesteld door deze te transplanteren in dieren waarin de eigen bloedcelvorming is verstoord. Hoewel uitgebreide in vitro en andere moleculaire analyses ook zullen worden gebruikt ter nadere karakterisatie, kan slechts het uitlezen van het vermogen van getransplanteerde stamcellen tot bloedcelvorming na vivo transplantatie de functie van de testen stamcellen definitief bepalen.
- Ook voor in vitro experimenten zullen eerst primaire stamcellen van stamceldonoren moeten worden geïsoleerd. Hoewel wij in ons lab ook geregeld gebruik maken van cellijnen, zijn juist in cellijnen het zelfvernieuwings- en differentiatieproces verstoord, en zijn deze dus beperkt toepasbaar.
- 
- 4.2 Vermindering  
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Voor iedere proef zal een inschatting worden gemaakt van de grootte van het te verwachten in vivo effect, en op grond daarvan zal het aantal benodigde dieren worden bepaald. Het is van belang om op te merken dat ons lab een meer dan 20-jarige ervaring heeft in het uitvoeren van experimenteel hematologische studies en beenmergtransplantaties, zodat in het algemeen een zeer goede inschatting gemaakt kan worden van het aantal benodigde dieren. Tevens zal, voordat over gegaan wordt tot in vivo stamceltransplantaties, eerst uitgebreid in vitro onderzoek plaats vinden met de gemanipuleerde test stamcellen, zodat ook op grond hiervan een inschatting kan worden gemaakt van het te verwachten effect.
- 
- 4.3 Verfijning  
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- De muis is in het veld van de experimentele hematologie het enige proefdiermodel dat gebruikt wordt. Onze eigen groep heeft 20+ jaar ervaring met dergelijke studies. Bloedcelvorming in de muis vertoont grote gelijkenissen met die van de mens.
- 
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen
- Dieren die gebruikt zullen worden als stamceldonor zullen weinig tot geen ongerief ervaren. De dieren die als stamcelontvanger worden gebruikt ontvangen voorafgaand en gedurende enige tijd na bestraling profylactisch antibiotica. Na transplantatie worden dieren dagelijks gemonitord, waarbij vooral gelet wordt op gewichtsafname, lichaamshouding en gedrag. Pijnbestrijding is niet noodzakelijk. Dieren die gedurende 2 weken progressief gewichtsverlies vertonen zullen, als ook

[

voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

andere signalen duiden op ongerief (gedrag/houding) worden getermineerd. Er zal extra worden gelet op de ontwikkeling van leukemieën, door middel van herhaaldelijk bloedafname.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Lifespan studies

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

### 2 Description of animal procedures

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

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

**Lifespan studies.** The primary outcome parameter of these experiments is to record lifespan measurements of different strains of mice. Secondary outcome parameters of these experiments are the correlation these lifespan statistics with functioning of the hematopoietic stem and progenitor cell pool. We will test the hypothesis that long-lived mouse strains have superior stem cell functioning compared to short-lived strains. Studies will start with cohorts of (recombinant) inbred strains of mice, from which at selected intervals a small number of mice will be terminated to evaluate changes in frequencies and

functioning of the hematopoietic stem cell pool.

In order to obtain hematopoietic stem and progenitor cells from mice of different ages, mice will be aged without further intervention. At selected timepoints animals will be sacrificed and cells and tissues will be isolated.

---

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

Animals will be aged without any intervention. Cohorts of mice will be sacrificed between 4-6 months of age, 12-14 months of age, and 22-26 months of age.

---

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

For each strain we will start an aging cohort of approximately 40 individual mice. At the three timepoints indicated above 5 mice will be removed from the cohort. We will need 5 mice per strain and timepoint in order to be able to obtain a sufficient number of hematopoietic stem cells. We are typically able to purify by flowcytometry ~ 10,000 hematopoietic stem cell from an individual mouse. To perform biochemical, genetic, and functional studies we need (at current) at the very least ~50,000 stem cells. From the cohort of 40 mice, 25 mice will remain to collect lifespan measurements. Typical lifespan studies in the literature use somewhat higher numbers of mice per cohort (ranging between 30-50 mice per experiment). However, in addition to wildtype C57BL/6 and DBA/2 mice, we plan to age so-called recombinant inbred BXD mice. The use of these mice allows for particular statistical considerations, explained below.

#### B. The animals

---

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

We plan to use female C57BL/6 and DBA/2 mice, and a large panel of so-called BXD recombinant inbred mice. The family of BXD strains is commercially available and comprises of ~150 fully inbred strains in which just over 5.2 million maternal C57BL/6 and paternal DBA/2 common sequence variants (SNPs, indels, CNVs, inversions) segregate. As each of the 150 strains is fully inbred, the collective family constitutes a permanent genetic reference panel, of which each strain/genotype can be repeatedly phenotyped. As we propose to embark on ageing studies, the BXD family enable us to age entire cohorts of genetically identical individuals—impossible with more classical F2 generation progeny, where each individual mouse is unique and no mean lifespan studies can be executed. All mice used will be either purchased from the Jackson Laboratory, or will be shared from collaborating scientists.

As pointed out above, we aim to establish cohorts of 40 mice from 100 strains selected from the available cohort of 150 strains. Five mice will be sacrificed at an age of 3-4 months, another 5 will be sacrificed at 12-14 months of age, 5 mice will be used at an age of 24-26 months, and the remaining (~25) mice will be used to establish lifespan/survival statistics. Some strains may not live to the age of 2 years, and those will be sacrificed when only 5 mice from the cohort remain. We plan to use female mice only. Although there is no reason to suspect that hematopoiesis is fundamentally different in males vs female mice, for logistical reasons (to avoid sex-mismatched stem cell transplants) we have historically only used female mice. There are sex-differences in lifespan, but there is no reason to assume that these are caused by differences in stem cell behavior.

The survival curves will be established with relatively few mice (on average 25 female mice/strain, but sometimes fewer). Although this is a lower number than used in studies where survival statistics for genetically modified mice are compared with wild type mice, in the BXD panel we will actually be able to compare for any of the 5.2 million genetic variants that segregate in all 100 strains whether and which the B6 or DBA allele is associated with differences in lifespan. Therefore, by pooling mice with identical haplotypes at a given locus we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

---

In total we estimate to use 4100 mice for these studies (100 BXD strains x 40 animals/strain = 4000 mice + 50 C57BL/6 + 50 DBA/2 parental strains)

#### C. Re-use

---

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: We will not be able to replace in vivo stem cell functioning experiments with in vitro assays, as stem cell activity is defined by functioning of stem cells after transplant.

Reduction: The use of BXD mice, in which only 2 alleles segregate at any polymorphic locus, allows to perform lifespan studies with relatively few mice per strain. The BXD mice are a perfect genetic reference panel to perform the proposed studies. A small collection of these mice has been used by us before and has led to multiple high profile publications, documenting the power of the approach. We will use the minimal number of mice needed to obtain sufficient biological material (hematopoietic stem cells).

Refinement: By pooling mice with identical haplotypes at a given locus, we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

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

Animals will be housed in IVC racks without any intervention, so suffering will be minimal, and most often absent Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed for aging mice in the Mouse Clinic for Cancer And Aging (MCCA) within our institute.

## Repetition and duplication

E. Repetition

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

We have established collaborations with the two labs that are also using the BXD mice (████████████████████) to avoid pertinent duplication.

## Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing process will be removed from the cohort

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Due to natural aging

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia and tumor development according to the system set up for MCCA.

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. We will implement a careful monitoring routine, most notably towards the end of their natural lifespan. This will involve individual monitoring of deviant behavior, cachexia and tumor development. Mice with visible tumors, mice that display progressive weight loss, and mice which show aberrant motor behavior will be euthanized. These endpoint criteria are difficult to define quantitatively, as the normal aging process is associated with highly variable phenotypes, and require individual monitoring/decision making. We will consult very regularly with the veterinarian, which will allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints

K. Classification of severity of procedures

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

mild and non-recovery

## End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Harvesting viable bone marrow cells requires sacrificing of donor mice.

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

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

Yes



## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Stem cell transplantation

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

### 2 Description of animal procedures

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

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

**Stem cell transplantation.** The overall primary outcome of the animal procedures described in this Appendix is to assess the functionality of hematopoietic stem cells. This functionality essentially measures how well transplanted test stem cells contribute to blood cell formation. Assessing the functional activity of hematopoietic stem cells requires the transplantation of such cells into the bloodstream of a recipient animal. Pretreatment of the recipient can vary from untreated, mildly treated to heavily treated (lethally irradiated) depending on the research question of the experiment. In most case, recipients are used



whose endogenous hematopoietic system is (temporarily) defect such that infused stem cells have a competitive advantage over endogenous stem cells. Transplanted stem cells will lodge to the bone marrow and re-establish hematopoiesis in the recipient. Transplanted stem cells can be obtained from fetal liver, cord blood, bone marrow, spleen or peripheral blood, and can be freshly isolated, in vitro cultured, or genetically modified. Transplanted stem cells can originate from same strain donor mice (and thus transplanted syngeneically in properly conditioned recipient mice), can originate from different strains (and thus be transplanted in an allogeneic settings), or can originate from human samples (and then be xenogeneically transplanted in immune deficient recipients).

---

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

Stem cell harvest: Hematopoietic stem cells can be harvested from fetal liver, bone marrow, spleen, or peripheral blood. Harvesting of hematopoietic stem cells requires sacrificing donor mice (or in cases where stem cells are isolated from fetal livers, pregnant mothers) that are otherwise unperturbed. In some experiments hematopoietic stem cells will be (re-)isolated from mice that previously received a stem cell transplantation.

Stem cell transplantation:

Recipient mice will be prepared for stem cell transplantation using total body irradiation or chemotherapy. The dose of TBI or chemotherapy will depend on the genetic background of the recipient. In some experiments we will use immune deficient hosts, which typically are radiosensitive and will therefore receive a low dose of radiation. For regular strains of mice (we will most often use C57BL/6 mice) the radiation dose needs to be much higher to efficiently deplete endogenous stem cells. We will also (explore the) use of strains of mice that do not require any irradiation or other pretreatment. Irradiation is a very effective way of host conditioning and will be (and has been) the preferred method. However, in some instances it may be useful to avoid radiation and administer recipient mice with chemotherapy, such as busulfan, or cyclophosphamide. This is particularly relevant if we want to avoid radiation of non-hematopoietic organs, such as liver, brain, and intestine, which cannot be avoided during total body irradiation. The protocol to condition mice with these cytotoxic drugs is well established (for example: *Down JD, Boudewijn A, Dillingh JH, Fox BW, Ploemacher RE. Br J Cancer. 1994 Oct; 70(4): 611-6. Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs*) Within 24 hrs after conditioning mice will receive a stem cell transplantation. This requires mice to be anesthetized and involves intravenous administration of a volume of ~100-200 ul, containing the stem cells. After transplantation mice will be prophylactically treated with antibiotics for a period of 2 weeks. After 2 weeks the hematopoietic system has typically recovered and antibiotic treatment can be suspended. In some cases it has been shown that transplantation directly into the bone marrow generates the best results, e.g. in the xenogeneic setting. To this end, a smaller volume (20 µl) will be injected directly into the femur of anaesthetized recipient mice.

To assess the functioning of the transplanted stem cells we will collect small volumes of peripheral blood at regular intervals, typically every 4-6 weeks. Mice will mostly be analyzed for at least 20 weeks, but some experiments may require longer periods of follow up with a maximum of one year. In some experiments bone marrow biopsies will be taken from previously transplanted recipients. This requires puncturing the femur and isolating a small volume of bone marrow cells (~50 ul) from a fully anesthetized mouse.

In some experiments mice will be transplanted with stem cells that have been genetically manipulated. In some instances such genetically manipulated stem cells originate from genetically modified donor mice. In most cases in which genetically altered stem cells will be transplanted to recipient mice the stem cells have been transduced with retro- or lentiviral vectors which encode for a gene of interest or carry a DNA tag (barcode) to allow for clonal analysis.

Administration of compounds: In some experiments the genes that were manipulated in transplanted stem cells may cause leukemia in the recipient. In other cases we will transplant leukemic cells, either from murine or from human origin. In these experiments recipient mice may be treated with compounds that affect disease progression. Typically, these compounds are drugs that may affect cell proliferation, either existing or novel. In addition, in some experiments mice may be treated with novel growth factors, cytokines, hormones, specific inhibitors or other biological compounds. The route of administration of compounds will vary from experiment to experiment, but may include subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration. For

subcutaneous administration requiring a stable, permanent release of the compound, implantable osmotic mini-osmotic pumps may be used.

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

In most experiments we will be comparing 2 groups of mice that have received 'control' or 'test' stem cells. The size of the effect is impossible to predict in most experiments, at least when we carry out a specific experiment for the first time. Our approach has been and will be to perform first a pilot experiment in which we have 5 mice in each experimental group. Depending on the size of the effect we repeat the experiment at least twice and maximally 4 times, using completely independently isolated test stem cells. The number of recipient mice can then be calculated based upon the observed effect in the pilot. This strategy will allow us to early detect biologically relevant effects, while at the same time minimizing the number of mice used as recipients.

#### B. The animals

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

As recipients we will only use mice, albeit of multiple strains. These include wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, C57BL/6 x C57BL/6.CD45.1 F1 mice, C-kit deficient W/W<sup>v</sup> mice, C-kit deficient W/W<sup>v</sup>.CD45.1 mice, immune deficient NSG mice, and potentially other immune deficient strains. Most mice will be purchased from commercial vendors, some strains will be bred in the local UMCG animal facility, and some strains will (at least initially) be obtained from collaborating labs.

Recipient mice will be young adults, typically between 10 weeks and 4 months old. We prefer to use female mice as we transplant donor stem cells in multiple recipient models, we want to avoid the confounding effects of sex-mismatch. However, at the same time we will make use of available mice most optimally, so if at instances only male mice are available, we will use these.

In the last 5 years we have carried out ~1000 stem cell transplantation per year, in which on average some 10 different genes or conditions were tested (ie 100 recipient mice are required to test the activity of one stem cell gene, compared to controls). Based upon the research objectives explained in the main project proposal form, we do expect that the collective research activities of our lab in the upcoming 5 years will be similar to what we have done in the last 5 years, and we therefore expect to evaluate some 50 different genes/conditions in a timeframe of 5 years. We typically transplant test stem cells in different concentrations and conditions to 80 primary or secondary recipient mice, and compare this with effects in 20 control mice. This results in the anticipated use of 100 recipient mice x 10 test conditions = 1000 recipient mice per year. Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 5000 recipient mice.

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Functional studies in the field of experimental hematology rely essentially exclusively on mice, and this species is therefore the preferred model system.

Reduction: The overall number of animals is based on the track record of the lab in the last 5 years. Due to inherent biological variation we typically transplant ~5 mice per tested stem cell population. This number allows for detection of a biological meaningful effect in a single experiment.

Refinement: For the various transplantation scenarios we will need genetically distinct strains of mice. Most experiments will use congenic recipients, but in cases where human cells will be transplanted we will use immunodeficient hosts. Immunodeficient hosts may also be used for genetically diverse donors (BxD recombinant inbred) which need to be compared in a common recipient strain. Stem cell transplantations have been carried out by my lab for over 15 years; although each particular experiment is a little different, and the exact experimental protocol varies (for example, with respect to cell dose, whether competitor cells are cotransplanted etc), the basic procedure is routine and follows internationally acceptable strategies.

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

Transplanted mice that are pre-irradiated with a high dose, will be kept on antibiotic prophylaxis in the drinking water from one day before irradiation until 10-14 days after the transplant, during a time when the animals are susceptible to infections due to a low white blood cell count (as a result of the conditioning regime, ie total body irradiation or high dose chemotherapy). To refine these experiments further, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored (weighed and observed for activity or other symptoms of illness). No other measurements are typically taken, nor are these necessary. The large majority of animals will not suffer from pain or fear. Mice that develop overt leukemia will be sacrificed, or will be treated with chemotoxic drugs in some experiments before they are expected to become sick. The administration of these compounds is typically well tolerated if the appropriate dosing is used, and is not associated with pain or fear.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Obviously, we are very well aware of what sorts of experiments our competitors, elsewhere in the world, are performing. We will only embark on novel stem cell transplantations if, to the best of our knowledge, these or very similar experiments are not being carried out elsewhere.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

#### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia, Isoflurane/air/oxygen is used for iv injections, blood draws and sacrifice by cervical dislocation.

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

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

fatigue, increased susceptibility to infections, weight loss, diarrhea

Explain why these effects may emerge.

Shortly after total body irradiation mice will display low blood cell counts. If the transplanted stem cells do not function properly, or delayed, animals will present with low red blood cell counts and platelets, which may lead to further anemia. The reduction of white blood cell counts renders mice susceptible to infections. To refine these experiments, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored. In some experiments mice may develop leukemia. Leukemia is also associated with a loss of functional mature blood cells, and the symptoms are therefore not different that described above. Mice will be kept for no longer than 12 months post-transplant.

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

A prophylactic administration of antibiotics typically is very effective in preventing infections. In our long history of stem cell transplantation we lose animals only very rarely. Mice that develop overt leukemia will be euthanized.

#### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

cachexia, lethargic behavior

Indicate the likely incidence.

Less than 5% in experiments in which wild type stem cells are transplanted. In experiments in which genetically modified, or primary leukemic stem cells are transplanted, this incidence is obviously much higher, and can be up to 100%

K. Classification of severity of procedures

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

mild in 90% of the proposed experiments, moderate in the remaining 10%, donors will be in the category 'non-recovery'

### End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Mice will not be killed after the stem cell transplantation as such, but at the end of the experiments we will also assess how the transplanted stem cells perform in the bone marrow, which requires sacrificing mice.

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Genereren nieuwe transgene muizenstammen"/> |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Als onderdeel van dit voorstel zullen we diverse nieuwe muizenstammen genereren en in voorkomende gevallen bestaande en nieuwe allelen combineren tot nieuwe transgene stammen. Het ligt in de verwachting dat in onze studies nieuwe kandidaat stamcelgenen zullen worden geïdentificeerd. In de meeste gevallen zal de expressie van dergelijke genen worden gestimuleerd of geremd door virale overexpressie/repressie. Echter, in voorkomende gevallen kan het noodzakelijk zijn om genetisch gemodificeerde muizen te genereren waarin geïnterfereerd wordt in de expressie of coding sequentie van dergelijke kandidaat stamcelgenen. Tevens kan het van belang zijn om nieuw ontwikkelde of reeds bestaande genetisch gemodificeerde muizen te kruisen met transgene dieren waarin bekende genen zijn gemanipuleerd, om zodoende nieuwe combinaties van allelen te bestuderen. Het genereren van nieuwe genetisch gemodificeerde

muizenstammen zal slechts worden uitgevoerd om de functionele relevantie van nieuw ontdekte stamcelgenen te onderzoeken. In de meeste gevallen zullen deze nieuwe genen voortkomen uit de studies beschreven in bijlage 1. Echter, in voorkomende gevallen kunnen ook andere kandidaatstamcelgenen, voortkomend uit studies van anderen, worden gemodificeerd.

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

In samenwerking met de UMCG Mouse Clinic zullen nieuwe genetisch gemodificeerde muizenstammen worden gegeneerd. In de overgrote meerderheid van de gevallen zullen de nakomelingen geen ongerief vertonen en na 2 generaties aangehouden worden als 'fok zonder ongerief'. Hematopoïetische stamcellen van de gegeneerde dieren zullen worden geïsoleerd en transplanteerd in wildtype ontvangers. In de meerderheid van de gevallen dienen de mutaties geïnduceerd te worden met drugs (docycycline, tamoxifen, PolyI/PolyC) en is er geen direct fenotype te verwachten in de nieuw te genereren stammen.

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

Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Ongerief zal beoordeeld worden op vele niveaus, t.w. algemene conditie, groei, vacht, houding en activiteit, kleur, eventuele andere zichtbare afwijkingen (GA Rodent Welfare Assessment zoals in gebruik door de CDP).

#### B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen uit eigen fok; voor dit type dierproef zullen volwassen muizen gebruikt worden. Gedurende de komende 5 jaar verwachten we maximaal 10 nieuwe genotype combinaties te genereren. Per genotype hebben we 48 muizen nodig, we vragen dan hiervoor ook  $10 \times 48 = 480$  dieren aan.

#### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Het gebruik van de muis zal in onze studies niet vervangen kunnen worden door in vitro proeven.

Vermindering: Voordat overgegaan zal worden tot het genereren van nieuwe transgene muizenstammen zal eerst uitgebreid onderzocht worden of een dergelijke mutante muizenlijn niet reeds eerder elders werd gemaakt. Slechts indien dit niet het geval is, of de reeds bestaande muizenlijn niet geleverd kan worden, zal overgegaan worden tot het genereren van nieuwe muizenlijnen.

Verfijning: Als muizenlijnen intrinsiek ongerief hebben, zullen we in de meeste gevallen ervoor kiezen deze lijn niet aan te houden (vermindering). Feitelijk zijn de 2 generaties van nieuwe genotypes 'pilots' om te bepalen of het zinvol is om een stam aan te houden. Verder leidt deze aanpak tot verfijning: als we ongerief constateren en het wetenschappelijk belang zwaarder weegt dan het ongerief in de stam, kunnen we er wel voor zorgen dat het ongerief tot een minimum beperkt blijft door verfijning toe te passen afhankelijk van het ongerief (aangepaste omgeving, andere kinetiek bij het fokken van de dieren, etc.)

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

Dieren zullen gedurende 2 generaties nauwgezet gevolgd worden op eventueel ongerief en we zullen verfijning toepassen, dan wel de foklijn stoppen bij eventueel ongerief.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Deze proeven zullen nog niet eerder zijn uitgevoerd. Hiervoor voeren we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uit en daarnaast spreken we met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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



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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Omdat het nieuwe genotypes betreft, kan er ongerief ontstaan. Onze muizenstammen hebben mutaties die leiden tot mogelijk verstoorde hematopoïese. Als er in de foklijnen ongerief zou optreden, dan zou dit komen uit het eventueel ontstaan van leukemie, of versnelde veroudering van het weefsel of degeneratie van het weefsel. In de meerderheid van de gevallen dienen de mutaties geïnduceerd te worden met drugs (docycycline, tamoxifen, PolyI/PolyC) en is er geen fenotype te verwachten in de nieuw te genereren stammen. Door onze voorgaande kennis kunnen we wel heel goed inschatten of een stam mogelijk ongerief zal ondervinden. In dergelijke gevallen zullen we dit ook van te voren bespreken met de IvD.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Mogelijk oorzaken zijn weefseldegeneratie en versnelde veroudering door stamcelverlies, of het ontstaan van leukemie.

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

In alle gevallen zullen 2 generaties van de nieuwe genotypes nauwgezet gevolgd worden voor ongeveer 3 maanden (generatietijd). In gevallen waar we op basis van voorgaande kennis ongerief verwachten, zullen we dit van te voren bespreken met de IvD.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het is niet geheel uit te sluiten dat sommige nieuw te genereren genotypes ernstige (ontwikkelings)defecten zullen laten zien. In geval dieren dergelijke afwijkingen laten zien, ernstige groeiachterstand hebben of ineens gewicht gaan verliezen, zullen dieren worden opgeofferd. Ongerief zal beoordeeld worden op vele niveaus, t.w. algemene conditie, groei, vacht, houding en activiteit, kleur, eventuele andere zichtbare afwijkingen (GA Rodent Welfare Assessment zoals in gebruik door de CDP). Verder zullen dieren worden opgeofferd indien lethargisch, of als ze ernstige vecht- bijt- of krabwonden hebben in overleg met

de biotechnici van de fokunits.

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

<5%. De meeste genetisch gemodificeerde muizen waarin de expressie van stamcelgenen is veranderd laten slechts een fenotype zien nadat stamcellen zijn getransplanteerd, en niet in een naieve -ongetransplanteerde- toestand

K. Classificatie van ongerief

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

Mild. In voorkomende gevallen zouden er uitschieters kunnen zijn naar 'matig'. Indien dat het geval is zal de fok worden gestopt

### Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Dieren worden gedood om er primaire cellen/weefsels uit te isoleren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.


Ja

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code 8023)
2. Titel van het project Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
3. Titel van de NTS Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam: DEC-RUG
  - telefoonnummer contactpersoon:   

  - mailadres contactpersoon: 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 24-09-2015
  - aanvraag compleet: 24-09-2015
  - in vergadering besproken: 06-10-2015
  - anderszins behandeld: 02-10-2015, 08-10-2015
  - termijnonderbreking(en) van / tot: 02-10-2015 tot 05-10-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t
  - aanpassing aanvraag: 05-10-2015
  - advies aan CCD: 13-10-2015
7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 02-10-2015
- Strekking van de vraag / vragen
- *Vragen/opmerkingen t.a.v. projectbeschrijving*
- 
- Punt 3.4.3 aanvraagformulier; hier staat een opmerking dat de mogelijkheid dit onderzoek te doen afhangt van het eventueel toekennen van beurzen om dit onderzoek te doen. Dit lijkt niet direct relevante informatie. Nergens wordt om een financiële dekking van de voorgestelde experimenten gevraagd.
- Ter ondersteuning van uw aanvraag is het raadzaam referenties van eigen werk te includeren in de aanvraag.
- Onduidelijk is of er een onderscheid gemaakt wordt tussen mannelijke of vrouwelijke dieren. Kunt u dit beter aangeven?
- Bij A. 'General design and primary outcome parameters' zijn de experimenten en uitkomstparameters niet erg gedetailleerd beschreven. Hierdoor is het aangevoerde benodigde dieraantal moeilijk navolgbaar. Kunt u waar mogelijk hier meer experimenteel detail in aanbrengen?
- *Vragen t.a.v. Bijlage 1*
- Veroudering in muizen kan gepaard gaan met diverse problemen, derhalve zouden humane eindpunten helderder gedefinieerd moeten worden.
- 
- *Vragen t.a.v. Bijlage 2*
- Dieraantallen is gebaseerd op aantallen transplantaties uitgevoerd in verleden. Een inschatting op grond van aantal te testen genen of stoffen is concreter. Kunt u, op grond van dit laatste, een onderbouwing geven voor de aantallen uit te voeren transplantaties?
- *Vragen t.a.v. Bijlage 3*
- Hier gaat het over het genereren van transgene dieren waarin nieuw geïdentificeerde stamcelgenen worden geïntroduceerd of gemuteerd. De te modificeren genen zijn niet erg concreet. Volgen de genen allemaal uit bijlage 1 of ook andere bronnen? Kunt u dit concreter maken?
- Datum antwoord: 05-10-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

De gevraagde verduidelijkingen zijn aangebracht en verwerkt in de project beschrijving en bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
  - Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) Ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren Ja
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering NVT

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) JA
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project JA
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd NVT
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

## Bijlage1-10: JA

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen NEE
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt

Per voorgestelde dierproef in de diverse bijlagen is het aantal dieren statistisch voldoende onderbouwd. Aangezien het doel van dit onderzoek het identificeren van genen is die betrokken zijn bij hematopoietische stamcelveroudering en hun rol het in eventuele ontstaan van leukemie, is op voorhand het aantal te onderzoeken genen niet vast te stellen.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. DE AANVRAAG IS VOLLEDIG IN OVEREENSTEMMING MET DE 3V's Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten NVT

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

De achtergrond van deze projectbeschrijving is een heldere uiteenzetting van aanleiding, achtergrond en context van het voorgestelde onderzoek. Het medisch en maatschappelijk belang van de voorgestelde dierproeven is helder.

## D. Ethische afweging

Dit onderzoek zal fundamentele inzichten verschaffen hoe veroudering tot depletie van of veranderingen in hematopoietische stamcellen kunnen leiden met o.a. leukemie als gevolg. Alvorens mogelijke therapieën te kunnen ontwikkelen is een fundamenteel begrip van het effect van veroudering op

hematopoietische stamcellen noodzakelijk. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor de mens en in bredere zin voor de samenleving.

De doeleinden van het project rechtvaardigen daarom het voorgestelde gebruik van dieren; de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en – zoals hierboven vermeld – worden de 3 V-s adequaat in acht genomen.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002015286

**Bijlagen**

2

Datum 21 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015286. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

### **Factuur**

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

### **Meer informatie**

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



Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 oktober 2015  
Geplande einddatum: 30 september 2020  
Titel project: Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoïetische stamcellen  
Titel niet-technische samenvatting: Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoïetische stamcellen  
Naam DEC: DEC-RuG  
Postadres DEC: Antonius Deusinglaan1, [REDACTED] 9713 AV Groningen  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Er zijn geen bijlagen ontvangen.

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Groningen  
Datum: 15 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002015286

**Bijlagen**

2

Datum 21 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 21 oktober 2015

Vervaldatum: 20 november 2015

Factuurnummer: 15700286

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015286	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A Deusingelaan 1

9713AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
AVD105002015286

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 1 december 2015

Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" met aanvraagnummer AVD105002015286.

**Welke informatie nog nodig**

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

- U wordt verzocht in het kader van vermindering voor elk van de onderzoeksvragen keuzemomenten vast te stellen bij de start van een dierproef, tussen de verschillende dierproeven en tussen de verschillende experimenten binnen een type dierproef.
- Daarnaast wordt u verzocht de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden en te beschrijven op basis waarvan bijvoorbeeld gekozen zal worden voor specifieke genen/mutaties.

De samenhang tussen de verschillende onderzoeksvragen in uw aanvraag is niet geheel duidelijk. Binnen een project dienen de proeven onderling samen te hangen en een gemeenschappelijk welomschreven toetsbaar doel te dienen. Uw aanvraag lijkt echter uit twee verschillende onderdelen te bestaan met elk een ander direct doel: 1) onderzoek naar hematopoietische stamcellen tijdens veroudering en 2) ontwikkeling en behandeling van leukemie.

-U wordt verzocht toe te lichten wat de samenhang is tussen onderzoeksvraag 5 enerzijds en de overige onderzoeksvragen anderzijds?

Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke onderzoeksvraag.

-U wordt verzocht voor elk van de dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag.

In dierproef 3.4.4.2 geeft u aan 5000 ontvanger dieren te gaan gebruiken. U geeft echter niet aan hoeveel donordieren u nodig heeft. Dit moet echter wel in uw vergunningsaanvraag worden opgenomen.  
-U wordt verzocht aan te geven hoeveel donordieren u nodig heeft (per transplantatie en in totaal).

**Datum**

1 december 2015

**Onze referentie**

AVD105002015286

**Opsturen informatie**

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk vrijdag 4 december 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie in de vorm van een brief onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD105002015286) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

**Wanneer een beslissing**

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut). De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte Commissie,

U heeft mij verzocht om aanvullende informatie betreffende mijn projectvergunningaanvraag getiteld "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" (AVD105002015286), hetgeen ik door middel van deze brief volgaarne doe.

U verzoek voor aanvullende informatie besloeg drie hoofdpunten:

1. U schreef: *-U wordt verzocht in het kader van vermindering voor elk van de onderzoeksvragen keuzemomenten vast te stellen bij de start van een dierproef, tussen de verschillende dierproeven en tussen de verschillende experimenten binnen een type dierproef.*

In mijn aanvraag heb ik de volgende 5 onderzoeksvragen centraal gesteld:

- a. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?
- b. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?
- c. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?
- d. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?
- e. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

U verzoek om meer duidelijkheid omtrent "*keuzemomenten bij de start van een dierproef, tussen de verschillende proeven en tussen verschillende experimenten binnen een type dierproef*" is niet heel specifiek. Ik interpreteer uw verzoek om keuzemomenten helderder definiëren als een uitnodiging om duidelijker aan te geven wanneer al dan niet over zal worden gegaan tot uitvoering van experimenten die gericht zijn op genoemde onderzoeksvragen a-e.

In het algemeen zal -vanzelfsprekend- pas worden overgegaan tot uitvoering van een proef als er uit de bestaande literatuur geen informatie, cq data, voorhanden zijn die de vraag reeds beantwoorden. Dit is keuzemoment 1. Keuzemoment 2 betreft de omvang van de studie, cq het benodigde aantal proefdieren. Dit aantal zal sterk afhangen van de te gebruiken technieken. Voor onderzoeksvraag a. spelen twee factoren een rol: ten eerste hebben we in voorgaand werk laten zien dat er gedurende veroudering veel heterogeniteit optreedt tussen individuele muizen. Waar jonge muizen over het algemeen weinig spreiding laten zien voor wat betreft meerdere stamcelparameters, is dat bij oude muizen niet het geval. Dit betekent dat, afhankelijk van het exacte experiment, er meer oude muizen dan jonge muizen nodig zullen zijn om statistisch voldoende solide data te genereren (zie bv onze publikatie [REDACTED]). Een tweede aspect bij onderzoeksvraag a. betreft de snelle ontwikkelingen op het gebied van (epi-) genetische profilering, met name Next Generation Sequencing. Dit leidt er toe dat steeds minder cellulair materiaal nodig is om goede metingen te verrichten, hetgeen leidt tot minder proefdieren. Het is onmogelijk om hier preciezer over te zijn, ook omdat elke epigenetische verandering



gemeten wordt op een unieke manier (cq. met unieke antilichamen), die meer of minder gevoelig zijn.

Voor onderzoeksvraag b. is een belangrijk criterium de grootte van het effect dat verwacht kan worden. Het intervenieren in stamcelfunctionaliteit met genetische (repressie of overexpressie constructen) of chemische middelen kan tot kleine of grotere effecten leiden. Op dit moment bijvoorbeeld voeren wij genetische studies uit met een specifiek microRNA, waarin we een erg groot effect zien en derhalve de groeps grootte van het gebruikte aantal muizen kleiner kan zijn. In alle gevallen zullen we eerst een pilot experiment uitvoeren waarin we een groep van 5 experimentele muizen vergelijken met een identiek grote groep van controle muizen. Slechts indien we een effect observeren in een dergelijke pilotstudie zal, op grond van deze resultaten, een herhalingsstudie worden ingezet met voldoende dieren per groep.

Voor onderzoeksvraag c. zijn de belangrijkste keuzemomenten om groeps grootte te bepalen het aantal cellen dat we kunnen isoleren van donordieren, en samenhangend daarmee de hoeveelheid cellen die we nodig hebben om epi-genetische studies uit te voeren. Met betrekking tot het laatste aspect is de trend dat we steeds meer met steeds minder cellen kunnen, hetgeen dus leidt tot kleinere groeps grootte (zie ook boven). In een deel van deze studies zullen transplantaties worden uitgevoerd, en die doen wij over het algemeen met een klein aantal cellen, zodat een klein aantal (3-5) donoren meestal voldoet.

Voor onderzoeksvraag d. zijn vanwege de geobserveerde heterogeniteit (zie bv onze publikatie Verovskaya, BLOOD 2013), relatief veel ontvangers nodig. Het keuzemoment hier wordt vrijwel uitsluitend bepaald door het aantal stamcelklonen dat we willen volgen om een goed spectrum aan in vivo gedrag te observeren. Vermindering wordt hier tot stand gebracht door het feit dat we meerdere -gebarcodeerde- klonen in één muis kunnen volgen. In eerdere studies werd 1 cel per ontvangermuis getransplanteerd, hetgeen leidde tot een veel groter aantal ontvangermuizen dan in de nu voorgestelde studies (vergelijk bv. [REDACTED]).

Voor onderzoeksvraag e. geldt feitelijk hetzelfde als bij d. We weten op dit moment weinig van de heterogeniteit van leukemische stamcelklonen, dus het is lastig om hier precies te zijn. Indien humane leukemieën uit veel klonen zullen bestaan is het aantal ontvangermuizen relatief hoog, terwijl bij weinig klonale heterogeniteit minder ontvangermuizen nodig zijn. Het keuzemoment zal hier worden bepaald door eerste pilotstudies, waarin een indruk zal worden gekregen van de aanwezige heterogeniteit.

2. Een tweede verzoek tot aanvulling betreft:

*-Daarnaast wordt u verzocht de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden en te beschrijven op basis waarvan bijvoorbeeld gekozen zal worden voor specifieke genen/mutaties. De samenhang tussen de verschillende onderzoeksvragen in uw aanvraag is niet geheel duidelijk. Binnen een project dienen de proeven onderling samen te hangen en een*

*gemeenschappelijk welomschreven toetsbaar doel te dienen. Uw aanvraag lijkt echter uit twee verschillende onderdelen te bestaan met elk een ander direct doel: 1) onderzoek naar hematopoietische stamcellen tijdens veroudering en 2) ontwikkeling en behandeling van leukemie.*

Het eerste deel van dit verzoek lijkt mij identiek als het eerste punt dat uw aanroert, namelijk welke de keuzemomenten zijn bij de start van een dierproef. Ik begrijp niet helemaal hoe dit anders is dan 'op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef zal worden gestart'. Ik refereer voor het eerste deel van de beantwoording van uw vraag derhalve naar mijn antwoord bij punt 1.

Het tweede aspect van uw verzoek betreft het beschrijven van de basis op grond waarvan gekozen zal worden voor specifieke mutaties. Deze genen zullen voortkomen uit de verschillende screens die we uitvoeren in het kader van onderzoeksvraag a en c. In het verleden hebben wij uit vergelijkbare screens bijvoorbeeld Ezh2, Cbx7 en mir125a geïdentificeerd als genen die een belangrijke rol spelen bij het op een juiste manier reguleren van het gedrag van hematopoietische stamcellen (zie [redacted]).

[redacted]. In het bijzonder zijn wij op dit moment geïnteresseerd in interactiepartners van Cbx7, en in microRNA125a targets. Wij hebben een lijst van ~10 genen geïdentificeerd die wij als kandidaatgenen zouden willen zien. Echter, meer in vitro voorwerk is nodig om te besluiten of er al dan niet in vivo vervolgstudies zullen volgen.

Om de functionele consequenties van dergelijke interactiepartners en/of microRNA targets te bestuderen zullen deze genen tot overexpressie worden gebracht, of juist worden onderdrukt. In eerste instantie in stamceltransplantatie-experimenten, waarbij genen ectopisch worden geïnduceerd. Echter, het is ook mogelijk dat in sommige gevallen genetisch gemodificeerde dieren zullen worden gemaakt. De uiteindelijke afweging om dergelijke dieren wel of niet te maken zal altijd afhangen van het wetenschappelijk belang. Als we de wetenschappelijke vraag kunnen 'oplossen' zonder genetisch gemodificeerde dieren te maken (hetgeen tot nu toe altijd het geval is geweest) zullen we dit traject vanzelfsprekend niet bewandelen. In een toenemend aantal gevallen bestaan er trouwens reeds genetisch gemodificeerde modellen, en zullen we deze niet zelf genereren.

Het laatste deel van uw verzoek (*'de samenhang van de verschillende onderzoeksvragen in uw aanvraag is niet geheel duidelijk'*) lijkt mij -opnieuw- te overlappen met het derde punt dat u in uw brief aanroert (*"U wordt verzocht toe te lichten wat de samenhang is tussen onderzoeksvraag 5 enerzijds en de overige onderzoeksvragen anderzijds?"*).

Ik zal, mijns inziens nogmaals, trachten te schetsen hoe de 5 onderzoeksvragen uit deze aanvraag nauw met elkaar samenhangen. Zoals ik in mijn aanvraag schreef betreft het hier onderzoeksvragen die parallel zullen worden uitgevoerd, maar die in experiment en in concept sterk overlappen. In gezamenlijkheid betreft het onderzoeksvragen die ten doel hebben om het biologisch gedrag van hematopoietische stamcellen te doorgronden. Gedurende ons leven functioneren deze stamcellen steeds slechter, maar we begrijpen niet hoe dat komt. Onderzoeksvragen a. t/m c. behelzen onderzoek naar genetische en epigenetische factoren die een rol spelen bij stamcelzelfvernieuwing, en hoe dit proces verstoord raakt gedurende veroudering. Als we begrijpen welke mechanismen exact verstoord raken gedurende veroudering

(onderzoeksvraag a. en c.), kan begonnen worden met na te denken of sommige van die processen niet omkeerbaar zijn (onderzoeksvraag b.). Een belangrijke vraag waar amper iets over bekend is, is van hoeveel stamcellen gedurende veroudering de perifere bloedcellen eigenlijk afkomstig zijn, en of dit aantal participerende stamcelklonen varieert gedurende veroudering. Technieken in ons lab hebben het mogelijk gemaakt dit soort klonale contributies accuraat te meten, en in onderzoeksvraag d. willen we dat in detail gaan uitzoeken. Deze klonale informatie is natuurlijk relevant in normale hematopoïese, maar we zullen ook onderzoeken of de klonaliteit van het hematopoïetisch systeem verandert als belangrijke stamcelzelfvernieuwingsgenen (voortkomend uit de screens in onderzoeksvraag a-c) tot overexpressie worden gebracht. Gaan in dat geval meer stamcellen participeren in bloedcelvorming, of gaan juist enkele (of slechts één) stamcellen meer bloedcellen produceren? Als het bloedvormende systeem gedurende veroudering klonaler wordt (dwz, veel bloedcellen zijn afkomstig van slechts enkele stamcellen), wordt dat algemeen gezien als een voorbode voor leukemie. Inderdaad is één van de klinische verschijnselen van een verouderend hematopoïetisch systeem de ontwikkeling van leukemie. Recent onderzoek laat zien dat de grens tussen normale, maar verouderende hematopoïese, en pathologische leukemie niet zwart-wit is, en dat er een fase van klonale hematopoïese voorafgaat aan leukemie ontwikkeling, en andersom, dat leukemieën meestal niet bestaan uit één uniforme kloon, maar uit meerdere, of zelfs vele, subkloons. Het gedrag van dergelijke leukemische subkloons is amper onderzocht, en de techniek die ontwikkeld is in ons lab en die voor onderzoeksvraag d. zal worden gebruikt, is ook voor onderzoeksvraag e. essentieel. We zullen kunnen vaststellen hoe klonaal, ouderdoms-geassocieerde leukemie is, en of dit van klinisch belang zou kunnen zijn (is een leukemie die uit één kloon bestaat minder kwaadaardiger, cq. gevoeliger voor cytostatica, dan een leukemie die uit meerdere klonen bestaat?). Tevens is het zeer wel mogelijk dat overexpressie van een deel van de genen die voortkomen uit onderzoeksvraag a.-c. na transplantatie tot leukemie leiden. Recente voorbeelden in ons lab zijn Cbx [REDACTED]. Hoewel deze genen leiden tot sterke stamcelzelfvernieuwing, onstond (daardoor?) ook in een flink deel van de muizen leukemie. Klonale informatie omtrent deze experimentele leukemieën (die wordt verkregen in onderzoeksvraag e.) is uiterst waardevol voor een beter begrip van leukemogenese.

Ik hoop dat bovenstaand schrijven u genoegzaam heeft overtuigd van het feit dat deze 5 onderzoeksvragen belangrijke samenhang bevatten. In het algemeen kan gesteld worden dat onderzoeksvragen a. en c. vooraf zullen gaan aan vraag b, die weer voorafgaat aan vragen d. en e. De onderzoeksvragen zijn naar mijn mening derhalve sterk samenhangend, maar ze zijn -met opzet- niet conditioneel afhankelijk van elkaar.

3. Uw laatste punten betreffen, mijns inziens wederom erg overlappende, zo niet identieke opmerkingen (1. " *Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke onderzoeksvraag*". en 2"-*U wordt verzocht voor elk van de dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag.*", en 3 "*In dierproef 3.4.4.2 geeft u aan 5000 ontvanger dieren te gaan gebruiken. U geeft echter niet aan hoeveel donordieren u nodig heeft. Dit moet echter wel in uw vergunningsaanvraag worden opgenomen.*", en tot slot 4 "-*U wordt verzocht aan te geven hoeveel donordieren u*

*nodig heeft (pertransplantatie en in totaal)."*

Ik neem aan dat deze 4 punten feitelijk allemaal een identiek aspect adresseren, namelijk een uw inziens onvolledigheid omtrent het exacte aantal proefdieren wat wij in ieder experiment zullen gaan gebruiken. Het is inderdaad zo dat het onmogelijk is exact aan te geven hoeveel proefdieren we in elk en ieder experiment zullen gaan gebruiken. Dit komt voor een groot deel voort uit het feit dat wij niet in staat zijn op dit moment in detail te schetsen welk experiment wij zullen uitvoeren; vanzelfsprekend worden dergelijke beslissingen genomen op grond van de resultaten van eerdere studies, en slechts als deze data beschikbaar komen kunnen en zullen we al dan niet nieuwe dierexperimenten gaan opzetten. Vaak is het zo dat één type experiment gebruikt wordt bij de beantwoording van meerdere onderzoeksvragen. Soms is het zelfs ook zo dat we in één fysiek experiment meerdere onderzoeksvragen trachten te beantwoorden.

Een deel van de verwarring komt daardoor mijns inziens voort uit het feit dat er twee parameters zijn die u hanteert; de **onderzoeksvraag** en de **experimentele handeling**. Uw opmerkingen hier boven suggereren dat u per **onderzoeksvraag** wilt weten hoeveel dieren worden gebruikt. Ik heb de onderzoeksvragen geformuleerd in het document getiteld "Form-Project Proposal", en in dat document lees ik nergens dat ik hier al geacht wordt aan te geven hoeveel proefdieren ik per onderzoeksvraag denk te gaan gebruiken. Ik laat mij graag corrigeren als ik iets over het hoofd zie, maar volgens mij wordt deze vraag niet in dit document gesteld.

De vraag omtrent het aantal te gebruiken proefdieren kom ik slechts tegen in het document "Appendix- Description of animal procedures". Bijgevoegd bij de oorspronkelijke aanvraag heb ik drie van dergelijke bijlagen. In deze bijlagen wordt nu niet meer gevraagd naar de **onderzoeksvragen**, maar naar de specifieke **experimenten**. Ik heb drie typen experimenten in kaart gebracht, en zoals gezegd voor ieder type experiment een bijlage toegevoegd. In elk van deze bijlagen heb ik het aantal te gebruiken proefdieren nader toegelicht:

Appendix 1: Lifespan studies. 4100 mice. U stelt hierover verder geen vragen.

Appendix 2: Stem cell transplantations. 5000 mice. Hier heb ik inderdaad geen onderscheid gemaakt tussen ontvangers en donoren. Het exacte aantal donoren en ontvangers dat per experiment gebruikt zal worden (u vraagt daar in uw schrijven expliciet naar) is onmogelijk te geven. Er zullen experimenten zijn waarbij cellen van 1 donor getransplanteerd worden in 10 ontvangers, maar deze verhouding is ook weleens 1:1. Tevens, in deze bijlage wordt gerefereerd aan immuundeficiente ontvangers, die gebruikt zullen worden voor humane xenotransplantaties. In die gevallen is er dus geen sprake van een muis als donor. Het beste wat ik hier kan doen is de te vermelden dat de verwachte ratio donor-recipient gemiddeld 1-4 bedraagt (1000 donoren en 4000 ontvangers).

Appendix 3: Genereren nieuwe transgene muizenstammen. 480 dieren. U stelt hierover verder geen vragen.

Ik hoop dat mijn antwoord op uw aanvullende vragen voor u voldoende aanleiding zijn om mijn aanvraag nu toe te kennen.

Met vriendelijke groet







> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A Deusingelaan 1

9713AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
AVD105002015286

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 30 december 2015

Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" met aanvraagnummer AVD105002015286.

**Welke informatie nog nodig**

Op 14 december 2015 heeft u ons aanvullende informatie verstrekt. U heeft één van de aan u gestelde vragen echter niet beantwoord.

De beoordeling van een aanvraag voor een projectvergunning omvat onder andere een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Indien informatie ontbreekt stelt de CCD vragen met als doel de ontbrekende informatie alsnog te verkrijgen. Dit betekent dat u alle gestelde vragen dient te beantwoorden om het voor de CCD mogelijk te maken uw aanvraag te beoordelen. U wordt daarom verzocht deze vraag alsnog te beantwoorden.

Het betreft onderstaande vraag:

Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke onderzoeksvraag.

-U wordt verzocht voor elk van de type dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag.

Daarnaast heeft u als antwoord op de vraag over de hoeveelheid te gebruiken donordieren aangeven dat u in Bijlage 3.4.4.2 geen onderscheid heeft gemaakt tussen donordieren en ontvanger dieren en dat u in totaal 5000 dieren gaat gebruiken. In Bijlage 3.4.4.2, onderdeel B, staat echter het volgende: "Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 5000 recipient mice". In

onderdeel B wordt ook verder niet gesproken over donordieren, wel over ontvanger dieren. U wordt verzocht de tekst in bijlage 3.4.4.2 aan te passen en, net als u voor de ontvanger dieren heeft gedaan, de stammen, levensstadia, herkomst en benodigde aantallen van de donordieren te specificeren.

**Datum**

30 december 2015

**Onze referentie**

AVD105002015286

**Opsturen informatie**

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie en de herziene bijlage 3.4.4.2 op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk dinsdag 5 januari 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie in de vorm van een brief onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD105002015286) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

**Wanneer een beslissing**

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut). De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



Geachte commissie,

Naar aanleiding van mijn antwoorden op uw aanvullende vragen stelt u mij opnieuw twee aanvullende vragen. In deze brief beantwoord ik deze beide vragen.

Vraag 1:

"-U wordt verzocht voor elk van de type dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag".

In mijn antwoord op uw eerste aanvullende vragen ben ik wel degelijk op dit punt ingegaan; ik schreef immers:

*"Uw opmerkingen suggereren dat u per onderzoeksvraag wilt weten hoeveel dieren worden gebruikt. Ik heb de onderzoeksvragen geformuleerd in het document getiteld "Form-Project Proposal", en in dat document lees ik nergens dat ik hier al geacht wordt aan te geven hoeveel proefdieren ik per onderzoeksvraag denk te gaan gebruiken. Ik laat mij graag corrigeren als ik iets over het hoofd zie, maar volgens mij wordt deze vraag niet in dit document gesteld. De vraag omtrent het aantal te gebruiken proefdieren kom ik slechts tegen in het document "Appendix- Description of animal procedures". Bijgevoegd bij de oorspronkelijke aanvraag heb ik drie van dergelijke bijlagen. In deze bijlagen wordt nu niet meer gevraagd naar de onderzoeksvragen, maar naar de specifieke experimenten. Ik heb drie typen experimenten in kaart gebracht, en zoals gezegd voor ieder type experiment een bijlage toegevoegd. In elk van deze bijlagen heb ik het aantal te gebruiken proefdieren nader toegelicht"*

U gaat in uw aanvullende vragen niet in op het punt dat ik hier maak, namelijk dat er nergens in de door uw opgestelde documenten gevraagd wordt om per onderzoeksvraag proefdiernaantallen te specificeren.

Na een email correspondentie met uw medewerker [REDACTED] (zij schrijft " *In de toelichting staat inderdaad niet beschreven dat het aantal te gebruiken dieren per onderzoeksvraag moet worden beschreven. Echter, indien in een project, zoals dat van jullie, meerdere onderzoeksvragen beantwoord gaan worden, wil de CCD wel graag een indicatie hebben hoeveel dieren voor elke onderzoeksvraag gebruikt gaan worden (een inschatting plus een onderbouwing daarvoor).*) begrijp ik dat ik geacht wordt deze informatie, die ik niet kwijt kan in de reguliere formulieren nu in deze aanvulling alsnog te geven, hetgeen ik hierbij doe:

Mijn aanvraag omvatte 5 onderzoeksvragen:

**1. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?**

-Hiervoor zullen (een deel van) de muizen worden gebruikt die ook dienen om onderzoeksvraag 3 te beantwoorden. Van muizen van verschillende leeftijden en genetische achtergronden zullen cellen worden geïsoleerd om 1. functionele studies uit te voeren (beenmergtransplantaties) en 2. materiaal uit te verzamelen voor een moleculaire analyse (meer specifiek; RNA en ChIP-Seq analyses). We schatten in voor deze studies 1500 donormuizen te gebruiken (100 stammen x 3 tijdstippen x 5 muizen per tijdstip). De resterende dieren die

verantwoord zijn in Appendix A ("Lifespanstudies"), paragraaf B (4100 - 1500 = 2600) zullen worden gebruikt voor lifespanstudies. Het betreft hier opnieuw 100 verschillende BXD stammen (25 dieren elk = 2500 muizen), aangevuld met C57BL/6 en DBA/2 (50 elk = 100 muizen).

## **2. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?**

Voor deze studies, beschreven in Appendix B ('beenmergtransplantaties'), zullen 5000 muizen worden gebruikt, onderverdeeld als 1000 donormuizen en 4000 ontvangermuizen.

In Appendix B ben ik, zoals u terecht opmerkt, ten onrechte vergeten de donormuizen expliciet te benoemen. Zoals ik u in mijn voorgaande reactie op uw aanvullende vragen reeds mededeelde, zijn per donormuis gemiddeld genomen 4 ontvangermuizen noodzakelijk.

In Appendix B worden wordt berekend dat wij voorzien in een periode van 5 jaar 4000 ontvangermuizen nodig te hebben (per test conditie -bv overexpressie/repressie van bepaalde genes, muizenstam, kweekcondities, etc- zullen gemiddeld 100 ontvangermuizen nodig zijn). In een periode van 5 jaar schatten wij in 40 van bovenstaande testcondities te zullen bestuderen (8 testcondities per jaar). Dit resulteert in  $5 \times 8 \times 100 = 4000$  ontvangermuizen.

Ik heb in Appendix 2 paragraaf B nu aangepast om dit onderscheid te maken, en stuur samen met dit antwoord op uw aanvullende vragen ook een correcte, nieuwe, versie van Appendix 2 mee. Ook heb ik in de correcte versie van Appendix B de details van de donormuizen nu aangegeven.

## **3. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?**

-Hiervoor zullen de 1500 muizen worden gebruikt die vermeld staan in Appendix A ("Lifespanstudies"). Een deel van deze muizen zal ook worden gebruikt om vraagstelling 1 (zie boven) te beantwoorden. en zijn hierboven nader gespecificeerd onder onderzoeksvraag 1.

Ook zullen voor deze onderzoeksvraag transplantaties worden uitgevoerd. Deze muizen die als beenmergontvanger dienen en staan gespecificeerd in Appendix B. Het betreft voor deze vraagstelling 102 verschillende testcondities (100 BXD stammen + C57BL/6 en DBA/2 ouderstammen). Waar we normaal ~100 ontvangermuizen nodig hebben voor elke testconditie (zie boven bij onderzoeksvraag 2), is de experimentele variatie tussen vers geïsoleerde stamcellen van verschillende muizenstammen erg laag, en zullen we met 5 ontvangerdieren per donorstam toekunnen. Hiervoor zijn derhalve  $102 \times 5 = 510$  ontvangermuizen nodig.

## **4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?**

De experimenten die voor de beantwoording van deze onderzoeksvraag noodzakelijk zijn staan beschreven in Appendix B. Het betreft hier experimenten waarin we muizen- of uit navelstrengbloed geïsoleerde humane stamcellen viraal barcoderen en transplanteren in (indien humane cellen worden gebruikt

immuundeficiente) ontvangermuizen. Wij verwachten in een tijdspanne van 5 jaar ongeveer 1000 ontvanger muizen en 250 donormuizen nodig te hebben voor deze experimenten. Deze muizen zullen tevens gebruikt worden voor vraagstelling 2

### **5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?**

Het betreft hier voornamelijk xenotransplantaties, waarin donorcellen afkomstig zullen zijn van leukemiepatiënten. De experimentele details staan beschreven in Appendix B. Wij voorzien van een 50-tal patiënten leukemische cellen te barcoderen en te transplanteren in immuundeficiente muizen. Per patiëntenmonster zullen gemiddeld 4 muizen kunnen worden getransplanteerd (afhankelijk van het aantal primaire leukemische cellen dat geïsoleerd en gebarcodeerd kan worden). Dit leidt dan tot een geschat aantal van 200 primaire immuundeficiente ontvangermuizen. In 20 experimenten zullen secundaire transplantaties worden uitgevoerd. Per primaire ontvanger zullen 5 secundaire ontvanger worden gebruikt, hetgeen resulteert in  $20 \times 5 = 100$  secundaire ontvangers. Totaal aantal muizen dat voor deze vraagstelling zal worden gebruikt bedraagt  $200 + 100 = 300$  muizen.

Vraag 2:

"Daarnaast heeft u als antwoord op de vraag over de hoeveelheid te gebruiken donordieren aangeven dat u in Bijlage 3.4.4.2 geen onderscheid heeft gemaakt tussen donordieren en ontvanger dieren en dat u in totaal 5000 dieren gaat gebruiken. In Bijlage 3.4.4.2, onderdeel B, staat echter het volgende: "Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 5000 recipient mice". In onderdeel B wordt ook verder niet gesproken over donordieren, wel over ontvanger dieren. U wordt verzocht de tekst in bijlage 3.4.4.2 aan te passen en, net als u voor de ontvanger dieren heeft gedaan, de stammen, levensstadia, herkomst en benodigde aantallen van de donordieren te specificeren".

Zoals ik hierboven reeds gemeld heb, heb ik inderdaad ten onrechte dit onderscheid niet gemaakt. In de herziene Appendix B, hier bijgevoegd, heb ik dit gecorrigeerd.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 13 januari 2016 10:31  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** FW: Aanvraag projectvergunning AVD105002015286: aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

De ongerief classificatie voor appendix is door de onderzoeker onterecht als terminaal (non-recovery) bestempeld. Dit zou mild ongerief moeten zijn. Hetzelfde geldt voor appendix 2

Deze respons heeft even geduurd omdat de DEC graag ruggenspraak wilde hebben met de onderzoeker.

Dat de duiding 'non-recovery' / terminaal wordt aangehaald bij dieren die geofferd worden is ook wel enigszins begrijpelijk.

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]  
**Verzonden:** dinsdag 29 december 2015 14:55  
**Aan:** Secretariaat DEC  
**Onderwerp:** Aanvraag projectvergunning AVD105002015286: aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning in behandeling waar u ons advies over heeft gegeven. Het gaat om het project "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" met aanvraagnummer AVD105002015286. Wij hebben nog twee vragen over de ongeriefsclassificaties in dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2.

In dierproef 3.4.4.1 is het ongerief voor een deel van de dieren ingeschat als terminaal. Uit de aanvraag blijkt echter niet dat er dieren zijn waarbij het ongerief als terminaal zou moeten worden ingeschat. Indien u van mening bent dat het ongerief voor een deel van de dieren toch als 'terminaal' zou moeten worden ingeschat, verzoeken wij u dit toe te lichten en aan te geven welke handelingen de dieren zullen ondergaan.

In dierproef 3.4.4.2 is aangegeven dat het ongerief voor donordieren ook als terminaal zou moeten worden ingeschat. Het alleen doden van dieren voor het isoleren van organen wordt echter geclassificeerd als licht ongerief. Kunt u ook voor dierproef 3.4.4.2 aangegeven waarom u van mening bent dat voor donordieren het ongerief als terminaal zou moeten worden ingeschat.

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de eerstkomende vergadering wil behandelen, zouden wij uw toelichting graag uiterlijk dinsdag 5 januari 2016 ontvangen.

Bij voorbaat hartelijk dank,

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

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

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



# Form

## Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

**Hematopoietic stem cells.** Most, if not all, tissues in our body contain a small population of stem cells that are essential to remain cellular homeostasis. The frequency and functional activity of these tissue-resident stem cells varies substantially from tissue to tissue. Arguably the best-characterized adult stem

cells are hematopoietic stem cells (HSC) that are normally located in the bone marrow and play an essential role in replenishing all the differentiated blood cell compartments. Although the various mature blood cell types, which include erythrocytes, granulocytes, platelets, macrophages and B- and T-lymphocytes, are morphologically and functionally highly distinct, they are all produced by the same population of HSCs. Seminal experimental transplantation studies in mice have proven that a single HSC is able to restore all blood cell types. The first experimental bone marrow transplantations were carried out in the mid 1950's, and the existence of HSCs was formally proven in the early 1960's. As such, it is safe to consider that HSCs are the founding fathers, or rather mothers, of the field of adult stem cell biology.

Clinical relevance of hematopoietic stem cells. After HSCs were first discovered, it did not take very long to realize their potential clinical relevance, and indeed the first bone marrow transplantations in patients with leukemia were carried out in the 1960's, leading to the Nobel Prize for E. Donnall Thomas in 1990. The clinical use of HSCs has been on the increase ever since. Beyond "classical" bone marrow transplantations, HSCs can now be isolated from cord blood and can be used as carriers for transgenes to treat various genetic deficiencies. Multiple exciting research programs are underway to assess whether it will be possible to generate, in vitro, functional mature blood cells (erythrocytes, platelets) from HSCs, to be used for transfusion/infusion purposes. In addition, lymphoid progeny of HSCs can possibly be used in immune therapy protocols. One very recent avenue of HSC research explores whether it may be possible to generate transplantable HSCs from non-stem cells. Therefore, although the field of HSC biology started in the mid 1950's, the full potential of using and manipulating these rare cells has been far from reached.

Stem cell ageing. Hematopoietic stem cells, as all adult, tissue-resident stem cells, ensure lifelong homeostasis. HSCs replenish blood cells that are lost as a result of trauma/bleeding, but more typically as a result of their age. The lifespan of individual blood cells ranges from several days (granulocytes) to months (erythrocytes) or years (memory B- cells), and mature blood cell compartments must therefore be constantly replenished from more primitive stem- and progenitor cell compartments. Therefore, stem cells can be considered as nature's (or the organism's) own anti-ageing agents; without the continuous, lifelong activity of stem cells, tissues would rapidly and prematurely degenerate. The converse corollary implies that protecting stem cells from the deleterious effects of ageing could contribute to an increased potential to maintain tissue homeostasis during the lifespan of an organism.

As pointed out above, HSCs are arguably the best understood stem cells, and consequently, of all adult stem cell types we have learned most about stem cell ageing in the field of hematology. From a clinical perspective, most patients with hematological conditions are elderly subjects. This holds true for patients suffering from a shortage of blood cells types (anemias, neutropenias, thrombopenias) as well as patients suffering from an excess of blood cells (myeloproliferative syndromes, chronic and acute leukemias). The increased incidence of hematological conditions with advanced age suggests that they may be originating from dysfunctional HSCs, in which the balance between selfrenewal and differentiation has become impaired.

Early serial transplantation studies in the field of HSC ageing have shown that the functional lifespan of HSCs exceeds the lifespan of the original donor mouse. Multiple studies, including our own, documented that, counter-intuitively, with age hematopoietic stem cells increase in number in the mouse. However, we showed that the functional activity of aged HSCs decreases substantially compared to their young counterparts (1). This is evident from single cell transplantation studies, but we also showed, using virally barcoded HSCs, that the clone size of aged HSCs is much smaller than that of young HSCs (2). Serial transplantation studies have documented that aged HSCs have reduced selfrenewal capacity, and display a preference for producing myeloid cells at the expense of lymphoid cells (aged HSCs become myeloid-biased or rather lymphoid-deficient) (reviewed in 3). Several lines of evidence indicate that in elderly humans fewer HSC clones contribute to hematopoiesis compared to young adults, suggesting exhaustion of many HSCs, and clonal dominance of some. Interestingly, very recent data indicate that such clonal dominance may arise from mutations in important 'selfrenewing' genes that confer a proliferative advantage to these cells. These potentially preleukemic cells may then in a time frame of many years, if not decades, accumulate additional mutations before they fully derail and become acutely leukemic. Interestingly, from large-scale sequencing efforts it is now evident that common preleukemic events very often involve genes that can be considered as epigenetic modifiers. Examples include DNMT3a, ID2, ASXL, and EZH2. In fact, my lab was the first to show that Ezh2 plays an important role in murine HSCs selfrenewal, and extends their functional lifespan (4). At the same time, however, it should also be realized that the (stem cell) ageing process is under genetic control. Whereas in experimental

hematology studies C57BL/6 mice are used in >95% of all cases (simply because many transgenic-, reporter-, and congenic strains exist in this background) it is very clear that hematopoiesis in other regular inbred strains of mice is often very different (5,6). Obviously, the same holds true for humans, where the genetic variation is even more diverse than in laboratory mouse strains. The natural genetic variation that is present in the many regular inbred strains that are available underlies impressive, but largely underexplored, physiological variability.

Although it is evident that hematopoietic stem cells lose functional activity during the ageing process, at present, the molecular mechanisms that contribute to hematopoietic stem cell ageing remain poorly understood.

References (from own work):



### 3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project is to identify and understand the molecular and cellular mechanisms that underly normal hematopoietic stem cell aging and its transformation towards leukemia. For this purpose we have established the following aims which we will address in the upcoming 5 years:

1. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?
2. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?
3. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?
4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?
5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

Our lab has 20+ years experience in experimental hematology, and has invested very substantially in the various technical approaches that are required to complete this research project. These include purification protocols of mouse hematopoietic stem cells (ref), single cell transplantations (ref), genetic (retro- or lentiviral) transductions of stem cells (ref), expansion of hematopoietic stem cells (ref), xenotransplantation of human normal and leukemic stem cells in immune-deficient recipients (ref), and transcriptome and epigenome profiling of limited numbers of stem cells (ref). Collectively, the availability



of this methodology ensures feasibility of the proposed studies.

### 3.3 Relevance

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

The population in many parts of the world, including the Netherlands, is gradually aging. Life expectancy has increased by ~40 years in the last 150 years, and all evidence suggests that a further increase will take place. Maintaining optimal stem cell functioning by preventing decline in their functioning, and may be even restoring stem cell potential in aged cells, will be of significant interest to combat and prevent age-related diseases. As most patients with hematopoietic failures are 65 years or older, the demographic changes in the developed world will lead to a very substantial increase in hematological patients seen in the Hospital. Understanding why hematopoietic stem cells decline in functionality in individuals with advanced age is essential to initiate efforts to design interventions aimed to improve stem cell functioning. Such interventions will consist of efforts to improve tissue homeostasis during ageing, prevent stem cell decline, and using stem cell therapies. The current research proposal aims to identify the molecular machinery that impacts on stem cell aging. Only if we understand how stem cells age, can we hope to begin designing anti-ageing intervention strategies.

### 3.4 Research strategy

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

The various subaims as specified in paragraph 3.2 will be pursued in parallel and not sequential subprojects, each carried out by different PhD students and postdocs, and supported by a permanent team of experienced research technicians. The research projects will be financed by different funding bodies, and are therefore relatively independent. Yet, the data obtained in the various subprojects are all addressing the fundamental question as to what makes hematopoietic stem cells age, and therefore methodology and results originating from one subproject will feed into other projects.

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

This proposal concerns 5 research questions, detailed below. The animal procedures, which are explained in detail in Appendix 1, 2, and 3, will be employed in all 5 research questions.

1. *what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?*

In this project we will isolate hematopoietic stem and progenitor cells from differentially aged mice, from distinct mouse strains. These cells will be characterized molecularly (RNA-Seq and Epi-Seq), and will be tested functionally in in vitro and in vivo experiments. To obtain stem and progenitor cells, donor mice will be aged and sacrificed at various timepoints. For functional testing, isolated cells will be transplanted in syngeneic or immune-deficient recipients, as explained in detail in Appendix 2. Often, these recipient mice will need to be properly conditioned by whole body irradiation. The fate of transplanted cells will then be monitored by assessing chimerism levels in blood, and at time of sacrifice in bone marrow, spleen, and thymus.

2. *can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?* In this project we will overexpress or repress/disrupt, candidate genes which we predict to alter hematopoietic stem cell behavior and assess the effect of such a genetic perturbation on stem cell functioning. In addition, we will culture stem cells in the presence of compounds predicted to alter their functioning and test this in appropriate in vitro and in vivo assays. Animal procedures in this project will include isolating stem cells from donor mice or human cord blood, genetically altering mice or cells using various genome-editing tools, transplanting genetically altered stem cells in recipients mice and monitoring chimerism levels in multiple tissues. Further details of the required animal procedures are explained in Appendix 2 and 3.

3. *how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?* In this project we will age mice from multiple distinct genotypes/strains, perform classical lifespan studies, and at specified timepoints

sacrifice otherwise unperturbed donor mice to collect stem cells, used for phenotyping at a molecular and functional level. Animal procedures are explained in Appendix 1, and will involve lifespan studies, and, as outlined above, hematopoietic stem cell transplantation.

4. *how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?* In this project we will assess how many stem cells contribute to blood cell formation after transplantation. For this purpose, hematopoietic stem cells will be isolated from donor mice or human cord blood, these cells will be lenti- or retrovirally transduced using vectors that are DNA barcoded (and in addition may or may not contain sequences encoding for genes of interest), after which transduced stem cells will be (xeno-) transplanted in properly conditioned recipients. Blood cell chimerism and barcode composition will be evaluated at various time points after transplant (Appendix 2). Upon termination of the experiment, mice are sacrificed to document barcode contribution in different cell types in various hematopoietic organs.

5. *how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?* Similar to the question as to how many stem cells contribute to normal blood cell development, we are also very much interested in how many leukemic stem cells maintain a tumor, ie how clonally diverse are cancer cells in one individual? In these studies we will barcode murine stem cells with a gene of interest, and similar as explained above, assess barcode composition upon transplanting modified cells in syngenic recipients. In addition, we will lentivirally barcode tumor cells from patients, and transplant these xenogeneically in immune deficient recipients. In all recipients chimerism levels will be assessed in blood at repeated time intervals, and at sacrifice in multiple hematopoietic organs (see Appendix 2 for more details).

These various subprojects will be pursued in parallel, and not sequentially. They will all include the same set of animal procedures (Appendix 1, 2, and 3), but the milestones for each project is separate, and milestones are not contingent upon each other. Yet, all projects contribute to the overall aim of the current application, namely to improve our understanding of what makes hematopoietic stem cells age.

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

All projects revolve around the central question as to how blood cell production is regulated and which are the genes that play a central role in this process. If we have found candidate stem cell genes, can we perturb/enhance functioning of hematopoietic stem cells by repressing or overexpressing these genes? Although the coherence between the various projects is therefore obvious, they will not be executed in a predetermined order.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Lifespan studies
2	Stem cell transplantation
3	Genereren nieuwe transgene muizenstammen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Stem cell transplantation

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

**Stem cell transplantation.** The overall primary outcome of the animal procedures described in this Appendix is to assess the functionality of hematopoietic stem cells. This functionality essentially measures how well transplanted test stem cells contribute to blood cell formation. Assessing the functional activity of hematopoietic stem cells requires the transplantation of such cells into the bloodstream of a recipient animal. Pretreatment of the recipient can vary from untreated, mildly treated to heavily treated (lethally irradiated) depending on the research question of the experiment. In most case, recipients are used

whose endogenous hematopoietic system is (temporarily) defect such that infused stem cells have a competitive advantage over endogenous stem cells. Transplanted stem cells will lodge to the bone marrow and re-establish hematopoiesis in the recipient. Transplanted stem cells can be obtained from fetal liver, cord blood, bone marrow, spleen or peripheral blood, and can be freshly isolated, in vitro cultured, or genetically modified. Transplanted stem cells can originate from same strain donor mice (and thus transplanted syngeneically in properly conditioned recipient mice), can originate from different strains (and thus be transplanted in an allogeneic settings), or can originate from human samples (and then be xenogeneically transplanted in immune deficient recipients).

---

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

Stem cell harvest: Hematopoietic stem cells can be harvested from fetal liver, bone marrow, spleen, or peripheral blood. Harvesting of hematopoietic stem cells requires sacrificing donor mice (or in cases where stem cells are isolated from fetal livers, pregnant mothers) that are otherwise unperturbed. In some experiments hematopoietic stem cells will be (re-)isolated from mice that previously received a stem cell transplantation.

Stem cell transplantation:

Recipient mice will be prepared for stem cell transplantation using total body irradiation or chemotherapy. The dose of TBI or chemotherapy will depend on the genetic background of the recipient. In some experiments we will use immune deficient hosts, which typically are radiosensitive and will therefore receive a low dose of radiation. For regular strains of mice (we will most often use C57BL/6 mice) the radiation dose needs to be much higher to efficiently deplete endogenous stem cells. We will also (explore the) use of strains of mice that do not require any irradiation or other pretreatment. Irradiation is a very effective way of host conditioning and will be (and has been) the preferred method. However, in some instances it may be useful to avoid radiation and administer recipient mice with chemotherapy, such as busulfan, or cyclophosphamide. This is particularly relevant if we want to avoid radiation of non-hematopoietic organs, such as liver, brain, and intestine, which cannot be avoided during total body irradiation. The protocol to condition mice with these cytotoxic drugs is well established (for example: *Down JD, Boudewijn A, Dillingh JH, Fox BW, Ploemacher RE. Br J Cancer. 1994 Oct; 70(4): 611-6. Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs*) Within 24 hrs after conditioning mice will receive a stem cell transplantation. This requires mice to be anesthetized and involves intravenous administration of a volume of ~100-200 ul, containing the stem cells. After transplantation mice will be prophylactically treated with antibiotics for a period of 2 weeks. After 2 weeks the hematopoietic system has typically recovered and antibiotic treatment can be suspended. In some cases it has been shown that transplantation directly into the bone marrow generates the best results, e.g. in the xenogeneic setting. To this end, a smaller volume (20 µl) will be injected directly into the femur of anaesthetized recipient mice.

To assess the functioning of the transplanted stem cells we will collect small volumes of peripheral blood at regular intervals, typically every 4-6 weeks. Mice will mostly be analyzed for at least 20 weeks, but some experiments may require longer periods of follow up with a maximum of one year. In some experiments bone marrow biopsies will be taken from previously transplanted recipients. This requires puncturing the femur and isolating a small volume of bone marrow cells (~50 ul) from a fully anesthetized mouse.

In some experiments mice will be transplanted with stem cells that have been genetically manipulated. In some instances such genetically manipulated stem cells originate from genetically modified donor mice. In most cases in which genetically altered stem cells will be transplanted to recipient mice the stem cells have been transduced with retro- or lentiviral vectors which encode for a gene of interest or carry a DNA tag (barcode) to allow for clonal analysis.

Administration of compounds: In some experiments the genes that were manipulated in transplanted stem cells may cause leukemia in the recipient. In other cases we will transplant leukemic cells, either from murine or from human origin. In these experiments recipient mice may be treated with compounds that affect disease progression. Typically, these compounds are drugs that may affect cell proliferation, either existing or novel. In addition, in some experiments mice may be treated with novel growth factors, cytokines, hormones, specific inhibitors or other biological compounds. The route of administration of compounds will vary from experiment to experiment, but may include subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration. For

subcutaneous administration requiring a stable, permanent release of the compound, implantable osmotic mini-osmotic pumps may be used.

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

In most experiments we will be comparing 2 groups of mice that have received 'control' or 'test' stem cells. The size of the effect is impossible to predict in most experiments, at least when we carry out a specific experiment for the first time. Our approach has been and will be to perform first a pilot experiment in which we have 5 mice in each experimental group. Depending on the size of the effect we repeat the experiment at least twice and maximally 4 times, using completely independently isolated test stem cells. The number of recipient mice can then be calculated based upon the observed effect in the pilot. This strategy will allow us to early detect biologically relevant effects, while at the same time minimizing the number of mice used as recipients.

#### B. The animals

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

As recipients we will only use mice, albeit of multiple strains. These include wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, C57BL/6 x C57BL/6.CD45.1 F1 mice, C-kit deficient W/W<sup>v</sup> mice, C-kit deficient W/W<sup>v</sup>.CD45.1 mice, immune deficient NSG mice, and potentially other immune deficient strains. As donor mice we will use wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, or DBA/2 mice. Most mice will be purchased from commercial vendors, some strains will be bred in the local UMCG animal facility, and some strains will (at least initially) be obtained from collaborating labs. Recipient mice will be young adults, typically between 10 weeks and 4 months old. We prefer to use female mice as we transplant donor stem cells in multiple recipient models, we want to avoid the confounding effects of sex-mismatch. However, at the same time we will make use of available mice most optimally, so if at instances only male mice are available, we will use these.

In the last 5 years we have carried out ~1000 stem cell transplantation per year, in which on average some 10 different genes or conditions were tested (ie 100 recipient mice are required to test the activity of one stem cell gene, compared to controls). Based upon the research objectives explained in the main project proposal form, we do expect that the collective research activities of our lab in the upcoming 5 years will be comparable to what we have done in the last 5 years, and we therefore expect to evaluate some 40 different genes/conditions in a timeframe of 5 years. We typically transplant test stem cells in different concentrations and conditions to 80 primary or secondary recipient mice, and compare this with effects in 20 control mice. This results in the anticipated use of 100 recipient mice x 8 test conditions = 800 recipient mice per year. Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 4000 recipient mice. We typically need 1 donor mouse per 4 recipient mice, to isolate sufficient stem cells. Although this donor-recipient ratio varies from experiment to experiment, and can vary from a 1:1 to a 1:20 ratio, a 1:4 ratio is the average number. This implies that we foresee to use 1000 donor mice in a period of 5 years. Collectively, these experiments will therefore use 1000 + 4000 = 5000 mice.

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Functional studies in the field of experimental hematology rely essentially exclusively on mice, and this species is therefore the preferred model system.

Reduction: The overall number of animals is based on the track record of the lab in the last 5 years. Due to inherent biological variation we typically transplant ~5 mice per tested stem cell population. This number allows for detection of a biological meaningful effect in a single experiment.

Refinement: For the various transplantation scenarios we will need genetically distinct strains of mice. Most experiments will use congenic recipients, but in cases where human cells will be transplanted we will use immunodeficient hosts. Immunodeficient hosts may also be used for genetically diverse donors (BxD recombinant inbred) which need to be compared in a common recipient strain. Stem cell transplantations have been carried out by my lab for over 15 years; although each particular experiment is a little different, and the exact experimental protocol varies (for example, with respect to cell dose, whether competitor cells are cotransplanted etc), the basic procedure is routine and follows internationally acceptable strategies.

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

Transplanted mice that are pre-irradiated with a high dose, will be kept on antibiotic prophylaxis in the drinking water from one day before irradiation until 10-14 days after the transplant, during a time when the animals are susceptible to infections due to a low white blood cell count (as a result of the conditioning regime, ie total body irradiation or high dose chemotherapy). To refine these experiments further, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored (weighed and observed for activity or other symptoms of illness). No other measurements are typically taken, nor are these necessary. The large majority of animals will not suffer from pain or fear. Mice that develop overt leukemia will be sacrificed, or will be treated with chemotoxic drugs in some experiments before they are expected to become sick. The administration of these compounds is typically well tolerated if the appropriate dosing is used, and is not associated with pain or fear.

### Repetition and duplication

#### E. Repetition

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

Obviously, we are very well aware of what sorts of experiments our competitors, elsewhere in the world, are performing. We will only embark on novel stem cell transplantations if, to the best of our knowledge, these or very similar experiments are not being carried out elsewhere.

### Accommodation and care

#### F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia, Isoflurane/air/oxygen is used for iv injections, blood draws and sacrifice by cervical dislocation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

fatigue, increased susceptibility to infections, weight loss, diarrhea

Explain why these effects may emerge.

Shortly after total body irradiation mice will display low blood cell counts. If the transplanted stem cells do not function properly, or delayed, animals will present with low red blood cell counts and platelets, which may lead to further anemia. The reduction of white blood cell counts renders mice susceptible to infections. To refine these experiments, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored. In some experiments mice may develop leukemia. Leukemia is also associated with a loss of functional mature blood cells, and the symptoms are therefore not different that described above. Mice will be kept for no longer than 12 months post-transplant.

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

A prophylactic administration of antibiotics typically is very effective in preventing infections. In our long history of stem cell transplantation we lose animals only very rarely. Mice that develop overt leukemia will be euthanized.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

cachexia, lethargic behavior

Indicate the likely incidence.

Less than 5% in experiments in which wild type stem cells are transplanted. In experiments in which genetically modified, or primary leukemic stem cells are transplanted, this incidence is obviously much higher, and can be up to 100%

K. Classification of severity of procedures

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

mild in 90% of the proposed experiments, moderate in the remaining 10%, donors will be in the category 'non-recovery'

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Mice will not be killed after the stem cell transplantation as such, but at the end of the experiments we will also assess how the transplanted stem cells perform in the bone marrow, which requires sacrificing mice.

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

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

Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------|
| 1             | Lifespan studies         |

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

**Lifespan studies.** The primary outcome parameter of these experiments is to record lifespan measurements of different strains of mice. Secondary outcome parameters of these experiments are the correlation these lifespan statistics with functioning of the hematopoietic stem and progenitor cell pool. We will test the hypothesis that long-lived mouse strains have superior stem cell functioning compared to short-lived strains. Studies will start with cohorts of (recombinant) inbred strains of mice, from which at selected intervals a small number of mice will be terminated to evaluate changes in frequencies and

functioning of the hematopoietic stem cell pool.

In order to obtain hematopoietic stem and progenitor cells from mice of different ages, mice will be aged without further intervention. At selected timepoints animals will be sacrificed and cells and tissues will be isolated.

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

Animals will be aged without any intervention. Cohorts of mice will be sacrificed between 4-6 months of age, 12-14 months of age, and 22-26 months of age.

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

For each strain we will start an aging cohort of approximately 40 individual mice. At the three timepoints indicated above 5 mice will be removed from the cohort. We will need 5 mice per strain and timepoint in order to be able to obtain a sufficient number of hematopoietic stem cells. We are typically able to purify by flowcytometry ~ 10,000 hematopoietic stem cell from an individual mouse. To perform biochemical, genetic, and functional studies we need (at current) at the very least ~50,000 stem cells. From the cohort of 40 mice, 25 mice will remain to collect lifespan measurements. Typical lifespan studies in the literature use somewhat higher numbers of mice per cohort (ranging between 30-50 mice per experiment). However, in addition to wildtype C57BL/6 and DBA/2 mice, we plan to age so-called recombinant inbred BXD mice. The use of these mice allows for particular statistical considerations, explained below.

#### B. The animals

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

We plan to use female C57BL/6 and DBA/2 mice, and a large panel of so-called BXD recombinant inbred mice. The family of BXD strains is commercially available and comprises of ~150 fully inbred strains in which just over 5.2 million maternal C57BL/6 and paternal DBA/2 common sequence variants (SNPs, indels, CNVs, inversions) segregate. As each of the 150 strains is fully inbred, the collective family constitutes a permanent genetic reference panel, of which each strain/genotype can be repeatedly phenotyped. As we propose to embark on ageing studies, the BXD family enable us to age entire cohorts of genetically identical individuals—impossible with more classical F2 generation progeny, where each individual mouse is unique and no mean lifespan studies can be executed. All mice used will be either purchased from the Jackson Laboratory, or will be shared from collaborating scientists.

As pointed out above, we aim to establish cohorts of 40 mice from 100 strains selected from the available cohort of 150 strains. Five mice will be sacrificed at an age of 3-4 months, another 5 will be sacrificed at 12-14 months of age, 5 mice will be used at an age of 24-26 months, and the remaining (~25) mice will be used to establish lifespan/survival statistics. Some strains may not live to the age of 2 years, and those will be sacrificed when only 5 mice from the cohort remain. We plan to use female mice only. Although there is no reason to suspect that hematopoiesis is fundamentally different in males vs female mice, for logistical reasons (to avoid sex-mismatched stem cell transplants) we have historically only used female mice. There are sex-differences in lifespan, but there is no reason to assume that these are caused by differences in stem cell behavior.

The survival curves will be established with relatively few mice (on average 25 female mice/strain, but sometimes fewer). Although this is a lower number than used in studies where survival statistics for genetically modified mice are compared with wild type mice, in the BXD panel we will actually be able to compare for any of the 5.2 million genetic variants that segregate in all 100 strains whether and which the B6 or DBA allele is associated with differences in lifespan. Therefore, by pooling mice with identical haplotypes at a given locus we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

In total we estimate to use 4100 mice for these studies (100 BXD strains x 40 animals/strain = 4000 mice + 50 C57BL/6 + 50 DBA/2 parental strains)

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: We will not be able to replace in vivo stem cell functioning experiments with in vitro assays, as stem cell activity is defined by functioning of stem cells after transplant.

Reduction: The use of BXD mice, in which only 2 alleles segregate at any polymorphic locus, allows to perform lifespan studies with relatively few mice per strain. The BXD mice are a perfect genetic reference panel to perform the proposed studies. A small collection of these mice has been used by us before and has led to multiple high profile publications, documenting the power of the approach. We will use the minimal number of mice needed to obtain sufficient biological material (hematopoietic stem cells).

Refinement: By pooling mice with identical haplotypes at a given locus, we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

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

Animals will be housed in IVC racks without any intervention, so suffering will be minimal, and most often absent. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed for aging mice in the Mouse Clinic for Cancer And Aging (MCCA) within our institute.

## Repetition and duplication

E. Repetition

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

We have established collaborations with the two labs that are also using the BXD mice [REDACTED] to avoid pertinent duplication.

## Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing process will be removed from the cohort

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Due to natural aging

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia and tumor development according to the system set up for MCCA.

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. We will implement a careful monitoring routine, most notably towards the end of their natural lifespan. This will involve individual monitoring of deviant behavior, cachexia and tumor development. Mice with visible tumors, mice that display progressive weight loss, and mice which show aberrant motor behavior will be euthanized. These endpoint criteria are difficult to define quantitatively, as the normal aging process is associated with highly variable phenotypes, and require individual monitoring/decision making. We will consult very regularly with the veterinarian, which will allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints

K. Classification of severity of procedures

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

95% of the animals are expected to suffer mild levels of discomfort as most will be used in non-recovery experiments without any prior suffering. the remaining animals may develop spontaneous age-associated discomfort, that may be classified as moderate.

## End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Harvesting viable bone marrow cells requires sacrificing of donor mice.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Stem cell transplantation

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

**Stem cell transplantation.** The overall primary outcome of the animal procedures described in this Appendix is to assess the functionality of hematopoietic stem cells. This functionality essentially measures how well transplanted test stem cells contribute to blood cell formation. Assessing the functional activity of hematopoietic stem cells requires the transplantation of such cells into the bloodstream of a recipient animal. Pretreatment of the recipient can vary from untreated, mildly treated to heavily treated (lethally irradiated) depending on the research question of the experiment. In most case, recipients are used

whose endogenous hematopoietic system is (temporarily) defect such that infused stem cells have a competitive advantage over endogenous stem cells. Transplanted stem cells will lodge to the bone marrow and re-establish hematopoiesis in the recipient. Transplanted stem cells can be obtained from fetal liver, cord blood, bone marrow, spleen or peripheral blood, and can be freshly isolated, in vitro cultured, or genetically modified. Transplanted stem cells can originate from same strain donor mice (and thus transplanted syngeneically in properly conditioned recipient mice), can originate from different strains (and thus be transplanted in an allogeneic settings), or can originate from human samples (and then be xenogeneically transplanted in immune deficient recipients).

---

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

Stem cell harvest: Hematopoietic stem cells can be harvested from fetal liver, bone marrow, spleen, or peripheral blood. Harvesting of hematopoietic stem cells requires sacrificing donor mice (or in cases where stem cells are isolated from fetal livers, pregnant mothers) that are otherwise unperturbed. In some experiments hematopoietic stem cells will be (re-)isolated from mice that previously received a stem cell transplantation.

Stem cell transplantation:

Recipient mice will be prepared for stem cell transplantation using total body irradiation or chemotherapy. The dose of TBI or chemotherapy will depend on the genetic background of the recipient. In some experiments we will use immune deficient hosts, which typically are radiosensitive and will therefore receive a low dose of radiation. For regular strains of mice (we will most often use C57BL/6 mice) the radiation dose needs to be much higher to efficiently deplete endogenous stem cells. We will also (explore the) use of strains of mice that do not require any irradiation or other pretreatment. Irradiation is a very effective way of host conditioning and will be (and has been) the preferred method. However, in some instances it may be useful to avoid radiation and administer recipient mice with chemotherapy, such as busulfan, or cyclophosphamide. This is particularly relevant if we want to avoid radiation of non-hematopoietic organs, such as liver, brain, and intestine, which cannot be avoided during total body irradiation. The protocol to condition mice with these cytotoxic drugs is well established (for example: *Down JD, Boudewijn A, Dillingh JH, Fox BW, Ploemacher RE. Br J Cancer. 1994 Oct; 70(4): 611-6. Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs*) Within 24 hrs after conditioning mice will receive a stem cell transplantation. This requires mice to be anesthetized and involves intravenous administration of a volume of ~100-200 ul, containing the stem cells. After transplantation mice will be prophylactically treated with antibiotics for a period of 2 weeks. After 2 weeks the hematopoietic system has typically recovered and antibiotic treatment can be suspended. In some cases it has been shown that transplantation directly into the bone marrow generates the best results, e.g. in the xenogeneic setting. To this end, a smaller volume (20 µl) will be injected directly into the femur of anaesthetized recipient mice.

To assess the functioning of the transplanted stem cells we will collect small volumes of peripheral blood at regular intervals, typically every 4-6 weeks. Mice will mostly be analyzed for at least 20 weeks, but some experiments may require longer periods of follow up with a maximum of one year. In some experiments bone marrow biopsies will be taken from previously transplanted recipients. This requires puncturing the femur and isolating a small volume of bone marrow cells (~50 ul) from a fully anesthetized mouse.

In some experiments mice will be transplanted with stem cells that have been genetically manipulated. In some instances such genetically manipulated stem cells originate from genetically modified donor mice. In most cases in which genetically altered stem cells will be transplanted to recipient mice the stem cells have been transduced with retro- or lentiviral vectors which encode for a gene of interest or carry a DNA tag (barcode) to allow for clonal analysis.

Administration of compounds: In some experiments the genes that were manipulated in transplanted stem cells may cause leukemia in the recipient. In other cases we will transplant leukemic cells, either from murine or from human origin. In these experiments recipient mice may be treated with compounds that affect disease progression. Typically, these compounds are drugs that may affect cell proliferation, either existing or novel. In addition, in some experiments mice may be treated with novel growth factors, cytokines, hormones, specific inhibitors or other biological compounds. The route of administration of compounds will vary from experiment to experiment, but may include subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration. For

subcutaneous administration requiring a stable, permanent release of the compound, implantable osmotic mini-osmotic pumps may be used.

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

In most experiments we will be comparing 2 groups of mice that have received 'control' or 'test' stem cells. The size of the effect is impossible to predict in most experiments, at least when we carry out a specific experiment for the first time. Our approach has been and will be to perform first a pilot experiment in which we have 5 mice in each experimental group. Depending on the size of the effect we repeat the experiment at least twice and maximally 4 times, using completely independently isolated test stem cells. The number of recipient mice can then be calculated based upon the observed effect in the pilot. This strategy will allow us to early detect biologically relevant effects, while at the same time minimizing the number of mice used as recipients.

#### B. The animals

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

As recipients we will only use mice, albeit of multiple strains. These include wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, C57BL/6 x C57BL/6.CD45.1 F1 mice, C-kit deficient W/W<sup>v</sup> mice, C-kit deficient W/W<sup>v</sup>.CD45.1 mice, immune deficient NSG mice, and potentially other immune deficient strains. As donor mice we will use wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, or DBA/2 mice. Most mice will be purchased from commercial vendors, some strains will be bred in the local UMCG animal facility, and some strains will (at least initially) be obtained from collaborating labs. Recipient mice will be young adults, typically between 10 weeks and 4 months old. We prefer to use female mice as we transplant donor stem cells in multiple recipient models, we want to avoid the confounding effects of sex-mismatch. However, at the same time we will make use of available mice most optimally, so if at instances only male mice are available, we will use these.

In the last 5 years we have carried out ~1000 stem cell transplantation per year, in which on average some 10 different genes or conditions were tested (ie 100 recipient mice are required to test the activity of one stem cell gene, compared to controls). Based upon the research objectives explained in the main project proposal form, we do expect that the collective research activities of our lab in the upcoming 5 years will be comparable to what we have done in the last 5 years, and we therefore expect to evaluate some 40 different genes/conditions in a timeframe of 5 years. We typically transplant test stem cells in different concentrations and conditions to 80 primary or secondary recipient mice, and compare this with effects in 20 control mice. This results in the anticipated use of 100 recipient mice x 8 test conditions = 800 recipient mice per year. Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 4000 recipient mice. We typically need 1 donor mouse per 4 recipient mice, to isolate sufficient stem cells. Although this donor-recipient ratio varies from experiment to experiment, and can vary from a 1:1 to a 1:20 ratio, a 1:4 ratio is the average number. This implies that we foresee to use 1000 donor mice in a period of 5 years. Collectively, these experiments will therefore use 1000 + 4000 = 5000 mice.

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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



#### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Functional studies in the field of experimental hematology rely essentially exclusively on mice, and this species is therefore the preferred model system.

Reduction: The overall number of animals is based on the track record of the lab in the last 5 years. Due to inherent biological variation we typically transplant ~5 mice per tested stem cell population. This number allows for detection of a biological meaningful effect in a single experiment.

Refinement: For the various transplantation scenarios we will need genetically distinct strains of mice. Most experiments will use congenic recipients, but in cases where human cells will be transplanted we will use immunodeficient hosts. Immunodeficient hosts may also be used for genetically diverse donors (BxD recombinant inbred) which need to be compared in a common recipient strain. Stem cell transplantations have been carried out by my lab for over 15 years; although each particular experiment is a little different, and the exact experimental protocol varies (for example, with respect to cell dose, whether competitor cells are cotransplanted etc), the basic procedure is routine and follows internationally acceptable strategies.

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

Transplanted mice that are pre-irradiated with a high dose, will be kept on antibiotic prophylaxis in the drinking water from one day before irradiation until 10-14 days after the transplant, during a time when the animals are susceptible to infections due to a low white blood cell count (as a result of the conditioning regime, ie total body irradiation or high dose chemotherapy). To refine these experiments further, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored (weighed and observed for activity or other symptoms of illness). No other measurements are typically taken, nor are these necessary. The large majority of animals will not suffer from pain or fear. Mice that develop overt leukemia will be sacrificed, or will be treated with chemotoxic drugs in some experiments before they are expected to become sick. The administration of these compounds is typically well tolerated if the appropriate dosing is used, and is not associated with pain or fear.

### Repetition and duplication

#### E. Repetition

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

Obviously, we are very well aware of what sorts of experiments our competitors, elsewhere in the world, are performing. We will only embark on novel stem cell transplantations if, to the best of our knowledge, these or very similar experiments are not being carried out elsewhere.

### Accommodation and care

#### F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia, Isoflurane/air/oxygen is used for iv injections, blood draws and sacrifice by cervical dislocation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

fatigue, increased susceptibility to infections, weight loss, diarrhea

Explain why these effects may emerge.

Shortly after total body irradiation mice will display low blood cell counts. If the transplanted stem cells do not function properly, or delayed, animals will present with low red blood cell counts and platelets, which may lead to further anemia. The reduction of white blood cell counts renders mice susceptible to infections. To refine these experiments, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored. In some experiments mice may develop leukemia. Leukemia is also associated with a loss of functional mature blood cells, and the symptoms are therefore not different that described above. Mice will be kept for no longer than 12 months post-transplant.

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

A prophylactic administration of antibiotics typically is very effective in preventing infections. In our long history of stem cell transplantation we lose animals only very rarely. Mice that develop overt leukemia will be euthanized.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

cachexia, lethargic behavior

Indicate the likely incidence.

Less than 5% in experiments in which wild type stem cells are transplanted. In experiments in which genetically modified, or primary leukemic stem cells are transplanted, this incidence is obviously much higher, and can be up to 100%

K. Classification of severity of procedures

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

mild in 90% of the proposed experiments, moderate in the remaining 10%, donors will be in the category 'non-recovery'

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Mice will not be killed after the stem cell transplantation as such, but at the end of the experiments we will also assess how the transplanted stem cells perform in the bone marrow, which requires sacrificing mice.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

T 0900-28 000 28 (10 ct/min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
AVD105002015286

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 02 februari 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 05 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen' met aanvraagnummer AVD105002015286. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 december 2015 en 19 januari 2016 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen.

### **Beslissing**

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

Uw aanvraag omvat drie bijlagen dierproeven. De ongeriefsclassificaties voor de studies beschreven in bijlage 3.4.4.1 'Lifespan studies' en bijlage 3.4.4.2 'Stem cell transplantation' zijn in de vergunning, na overleg met de DEC, aangepast. In beide bijlages heeft u aangegeven dat voor een deel van de dieren het ongerief ingeschat moet worden als 'terminaal'. Het doden van dieren voor het isoleren van organen zonder voorgaande handelingen wordt echter geclassificeerd als licht ongerief.

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) U heeft aangegeven voor dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 met name vrouwelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van voornamelijk vrouwelijke dieren in deze dierproeven heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. De redenen hiervoor zijn voornamelijk logistiek van aard: het voorkomen van 'sex-mismatched' stamceltransplantaties. U geeft zelf echter al aan dat er geen reden is om aan te veronderstellen dat er geslachtsafhankelijke verschillen in stamcelfunctionaliteit zijn. U geeft ook aan optimaal gebruik te willen maken van beschikbare dieren en om die reden voor dierproef 3.4.4.2 soms ook mannelijke dieren te gebruiken. Wij zijn het met u eens dat er geen reden is om te veronderstellen dat er verschillen zijn tussen hematopoietische stamcellen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Voor het voorkomen van 'sex-mismatched' stamceltransplantaties is het echter niet noodzakelijk om alleen één geslacht te gebruiken.

Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten daarom in dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 in evenredige aantallen gebruikt worden. Het blijft wel toegestaan de proeven zodanig op te zetten dat sex-mismatched' stamcel transplantaties voorkomen kunnen worden. U kunt een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

2) Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen' starten. De vergunning wordt afgegeven van 02 februari 2016 tot en met 30 september 2020.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG d.d. 13 oktober 2015. De DEC heeft op 13 januari 2016 aanvullend geadviseerd naar aanleiding van een vraag over de ongeriefclassificaties in dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. We nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

#### **Ter informatie**

Wij signaleren dat in onderdeel D van de bijlage dierproeven niet in voldoende mate is uitgewerkt waarom de doelstellingen van het project niet kunnen worden behaald zonder gebruik te maken van dieren. De CCD heeft dankzij beschikbare kennis binnen de commissie op het gebied van hematopoietische stamcellen desondanks toch een oordeel kunnen vormen over uw aanvraag.

Wij verzoeken u in toekomstige projectvergunningaanvragen in onderdeel D van de bijlage dierproeven aan te geven welke andere mogelijkheden voor vervanging u heeft overwogen en te beargumenteren waarom u deze mogelijkheden niet geschikt acht. Daarnaast dient u uitgebreider te onderbouwen waarom het met deze proef beoogde doel niet kan worden bereikt zonder gebruik te maken van dieren.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

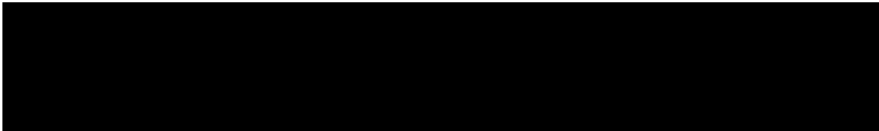
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Postbus: A. Deusinglaan 1  
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 februari 2016 tot en met 30 september 2020, voor het project 'Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen' met aanvraagnummer AVD105002015286, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat de CCD van mening is dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt kunnen worden. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning. In overleg met de DEC zijn de ongeriefsclassificaties in bijlage 3.4.4.1 'Lifespan studies' en bijlage 3.4.4.2 'Stem cell transplantation' aangepast.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 05 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 05 november 2015 en 27 november 2015, een herziene bijlage 3.4.4.1, zoals ontvangen op 02 februari 2016 en een herziene bijlage 3.4.4.2, zoals ontvangen op 19 januari 2016 en 02 februari 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 05 november 2015 en een herziene NTS, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 februari 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 05 november 2015;
  - d. Aanvullende informatie aanvrager, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 december 2015 en 19 januari 2016;
  - e. Aanvullend advies DEC, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 januari 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Lifespan studies	Muizen	4100	Licht
Stem cell transplantation	Muizen Donordieren Ontvanger dieren	1000 4000	Licht Licht 90%, Matig 10%
Genereren nieuwe transgene muizenstammen	Muizen	480	Licht

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

- 1) Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden. Het blijft wel toegestaan de proeven zodanig op te zetten dat sex-mismatched' stamcel transplantaties

voorkomen kunnen worden. Indien de aanvrager van mening is dat bij gebruik van beide geslachten de doelstellingen toch niet gehaald kunnen worden, mag de aanvrager de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

**Algemene voorwaarde**

- 1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

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

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

Uit artikel 13c 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 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.