

Inventaris Wob-verzoek W15-08									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTSAVD2015115, monocyte subpopulaties</b>								
1	projectvoorstel				x	x		x	
2	ontvangstbevestiging				x		x		
3	Niet technisch samenvatting	x							
4	Dec advies				x		x		
5	dierproef				x	x		x	
6	factuurgegevens				x		x		
7	brief aanhouden beoordelen				x		x		
8	aanvraagformulier				x		x	x	
9	antwoorden onderzoeker				x	x	x		
10	beschikking				x		x	x	
11	correspondentie over factuur dd 16-6-2015				x		x		
12	mail terugkoppeling proces aan DEC dd 1-7-2015				x		x		
13	advies aan CCD		x						x

### Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website([www.zbo-ccd.nl](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'. | 10300  |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartritis en reumatoide artritis. |

## 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research<br><input type="checkbox"/> Translational or applied research<br><input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production<br><input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier<br><input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures<br><input type="checkbox"/> 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.

Reumatoïde artritis (RA) is een invaliderende ziekte als gevolg van chronische gewrichtsontstekingen en ernstige erosie van kraakbeen en bot in meerdere gewrichten. Hierbij speelt de ontstekingsreactie een cruciale rol in de initiatie van de pathologie. Osteoartritis (OA) daarentegen, is lange tijd beschouwd als een "wear-and-tear" ziekte, waarbij een ontstekingsreactie in het synovium geen significante rol speelt, aangezien deze veel minder hoog is vergeleken met RA patiënten. De laatste jaren is er een groeiende interesse voor de rol van de ontstekingsreactie in OA en wordt verondersteld dat de relatief lage synoviale activatie wel degelijk een grote rol kan spelen in de ontwikkeling van schade aan kraakbeen en bot tijdens OA, echter de exacte rol moet nog worden onderzocht (Bryan & Terkelbaut, 2015, Nat Rev Rheumatol).

De infiltratie van immuun-cellen in het ontstoken gewricht is een cruciaal proces in de instandhouding van de ontsteking en de daaropvolgende schade aan bot en kraakbeen. Naast granulocyten, zullen ook monocytten de ontsteking infiltreren. In het ontstoken gewricht kunnen de monocytten pro-inflammatoire cytokines en chemokines afgeven, maar ze kunnen ook differentiëren tot macrofagen. Dit zal de ontsteking in stand houden en zal leiden tot bot en kraakbeen schade in beide ziektebeelden.

In muizen zijn twee sub-populaties van monocytten beschreven; Ly6C-high monocytten die als pro-inflammatoir worden beschouwd en Ly6C-low monocytten welke een rol spelen in herstel mechanismen van weefsel. Een functionele rol van beide monocyte populaties is al aangetoond in meerdere inflammatoire (met name atherosclerose) en infectie-ziekten (Swirski & Nahrendorf, 2013, Science). In deze studies zijn de verschillende functies van beide subsets uitvoerig onderzocht en is gebleken dat beide monocyte subsets in verschillende fases van het ziekteproces de ontsteking infiltreren. Eerst vindt infiltratie van de Ly6C-high monocytten plaats, welke de ontsteking in stand houdt en het eventuele debris van cellen verwijderd, daarna vindt influx van Ly6C-low monocytten plaats welke de resolutie van de ontsteking stimuleert en eventueel beschadigd weefsel kan helpen herstellen. Deze differentiële infiltratie van de verschillende monocyte populaties wordt gecoördineerd in het beenmerg (BM) en milt, in beide organen vindt monocyte productie plaats. Het is echter nog niet duidelijk welke signalen verantwoordelijk zijn voor de differentiële efflux van de verschillende monocyte subsets vanuit het BM of milt (Pitet et al., 2014, Ann N Y Acad Sci).

Mogelijke signaal stoffen die hierbij betrokken kunnen zijn, zijn [REDACTED]. Deze eiwitten zijn leden van de [REDACTED] familie van eiwitten die geclassificeerd kunnen worden als [REDACTED] of [REDACTED]. [REDACTED] komen tijdens RA en OA in grote hoeveelheden vrij in het ontstoken gewricht en worden voornamelijk afgescheiden door geactiveerde macrofagen (Foell et al., 2007, Nat Clin Pract [REDACTED]). De macrofaag zorgt vervolgens voor verdere [REDACTED] secretie door andere macrofagen via de [REDACTED] te

activeren. De vrijgekomen [redacted] stimuleren vervolgens de productie van kraakbeen-afbrekende enzymen. Naast een directe rol in kraakbeenschade spelen [redacted] ook een rol in de migratie en infiltratie van immuun cellen (o.a. monocytten) naar de ontsteking. Daarnaast wordt de differentiatie van monocytten in het BM gereguleerd via [redacted] activatie. Naast een systemisch effect van [redacted] op de monocytose in BM en milt, kunnen [redacted] ook een effect hebben op de inflammatoire capaciteit van de monocytten en kan het een lokaal effect hebben in het kniegewricht waarbij het de infiltratie van monocytten verhoogd.

Naast [redacted] zijn ook andere signaal stoffen en cytokines mogelijk betrokken bij de regulatie van monocyte differentiatie, infiltratie en activatie, zoals bijvoorbeeld moleculen betrokken bij [redacted] signaling, zoals [redacted] en [redacted] (Jin & Cao, 2014, Aust Dent J) en moleculen betrokken bij [redacted] metabolisme, zoals [redacted] en [redacted] (Murphy et al., 2011, JCI).

De functionele rol van deze twee monocyte sub-populaties tijdens de ontwikkeling van experimentele RA of OA zijn echter nog niet beschreven. De studies in dit projectvoorstel zullen derhalve unieke inzichten verschaffen in de mogelijke rol van verschillende monocytten in RA en OA en daarmee internationaal wetenschappelijk toonaangevend zijn. Daarnaast zal deze informatie inzicht geven in mogelijke nieuwe targets voor therapie tegen RA en OA, welke ook getoetst zullen worden in deze studie. **Dit onderzoek vindt plaats binnen een goedgekeurd [redacted] project.**

### 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?

De hoofddoelstelling van dit projectvoorstel is:

- **Het vaststellen en karakteriseren van infiltrerende Ly6C-high en Ly6C-low monocytten in het aangedane gewricht tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA.**
- **Het bepalen welke signaal stoffen uit het aangedane gewricht een rol spelen in de infiltratie van Ly6C-high en Ly6C-low monocytten.**
- **Toetsen of inhibitie van deze signaal stoffen zal leiden tot een vermindering van ontsteking en gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA.**

Het projectvoorstel bestaat uit meerdere onderdelen met elk hun eigen doelstelling:

1. Het vaststellen van de infiltratie van Ly6C-high en -low monocyte in het aangedane gewricht in verschillende stadia van experimentele OA en RA (dierproef 1).
2. Het karakteriseren van de functionele aspecten van Ly6C-high en -low monocytten in verschillende OA en RA modellen middels ex-vivo en in-vitro experimenten (dierproef 2).
3. Het vaststellen van systemische effecten van signaalstoffen (b.v. [redacted] etc.) op de differentiatie en efflux van Ly6C-high en -low monocytten in BM en milt in verschillende OA en RA modellen (dierproef 3).
4. Het karakteriseren van de rol van signaalstoffen (b.v. [redacted] etc.) op de functionele aspecten van Ly6C-high en -low monocyte in verschillende OA en RA modellen middels ex-vivo en in-vitro experimenten (dierproef 4).

5. Het vaststellen van de lokale effecten van signaal stoffen (b.v. [REDACTED] etc.) in het gewricht op de infiltratie van Ly6C-high en -low monocytten in verschillende OA en RA modellen (dierproef 5 en 6).
6. Het bepalen van de potentie van het inhiberen van monocytten om zo ontsteking en gewrichtsschade in verschillende OA en RA modellen te verlagen (dierproef 7).
7. Het toetsen van therapeutische targets om Ly6C-high monocyte infiltratie te beperken en zo de ontsteking en gewrichtsschade in verschillende OA en RA modellen te verlagen (dierproef 8).

Wij zijn van mening dat bovenstaande doelstellingen haalbaar zijn, om met de dierproeven beschreven in dit projectvoorstel, binnen de gestelde periode van 5 jaar deze studies uit te voeren. Alle expertise en middelen zijn aanwezig op de afdeling [REDACTED] om deze doelstellingen te behalen. Er is ruime ervaring in het induceren en histologisch analyseren van de gewrichtsschade van alle beschreven OA en RA modellen. Daarnaast zijn alle muizen in fok in het [REDACTED] of verkrijgbaar bij gangbare leveranciers.

### **3.3 Relevance**

---

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

---

Deze studie zal voor het eerst inzicht verschaffen in de rol van Ly6C-high en -low monocyte infiltratie in ontstoken gewrichten tijdens RA en OA. Daarnaast zal voor het eerst onderzocht worden of een lokaal inflammatoir signaal een systemisch effect kan hebben op de differentiatie en efflux van monocyte sub-populaties in het BM of milt waardoor een positieve feedback ontstaat die de ontsteking in deze ziektebeelden in stand kan houden. Deze studie naar het werkingsmechanisme van monocytten betrokken bij het ontstaan en verergeren van RA en OA zal tevens een basis vormen voor nieuwe therapieën, welke zal worden getoetst in dit project.

Zowel RA als OA zijn invaliderende ziekten die een hoge prevalentie hebben. Beide ziekten hebben grote gevolgen voor het individu en de maatschappij (kosten gezondheidszorg). Kennis van de rol van monocyte infiltratie en van betrokken signaal stoffen tijdens RA en OA, kan leiden tot de ontwikkeling van medicijnen om de pro-inflammatoire effecten van deze monocytten in deze ziekten tegen te gaan.

### **3.4 Research Strategy**

---

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

---

De beschreven dierproeven in deze project-aanvraag kunnen worden ingedeeld in 3 studies/hoofdpijnen en kunnen simultaan worden uitgevoerd:

1. Beschrijving van monocyte subsets in experimentele OA en RA
2. De rol van signaal stoffen in migratie van monocyte subsets in experimentele OA en RA
3. Het inhiberen van monocyte subsets middels het toedienen van een biological welke aangrijpt op een target eiwit aanwezig op de monocyte subsets om zo gewrichtsschade in experimentele OA en RA te beperken.

#### **Beschrijving van monocyte subsets in experimentele OA en RA**

- De kinetiek van Ly6C-high en -low monocytten zal in verschillende organen en weefsels (inclusief het aangedane kniegewricht) worden bepaald op verschillende tijdstippen tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA (dierproef 1).
- Gelijktijdig zullen de functionele karakteristieken van de twee monocyte subsets, m.b.t. ontsteking en gewrichtsschade, worden bepaald m.b.v. ex-vivo en in-vitro analyses (dierproef 2). Hiervoor zijn donor dieren nodig waarin de OA en RA modellen zijn geïnduceerd, aangezien

er geen muizen monocyte cellijn bestaat. Deze data zijn nodig om veranderingen in de monocyte subsets waargenomen in dierproef 1 functioneel te kunnen interpreteren.

### **De rol van signaal stoffen in migratie van monocyte subsets in experimentele OA en RA**

- Centraal in dit projectvoorstel is het onderzoek naar de rol van signaal stoffen op de differentiatie en efflux van de twee monocyte subsets uit BM en milt. Hiervoor zullen de monocyte subsets worden beschreven in knock-out muizen waar deze signaal stof ontbreekt (dierproef 3). Deze data zullen aantonen dat een lokale ontsteking via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben op de regulatie van monocyte subsets in het BM en milt en zo een positieve feedback-loop bewerkstelligt voor de instandhouding van de ontsteking.
- Gelijktijdig met dierproef 3 zullen de functionele karakteristieken van de twee monocyte subsets van deze knock-out muizen worden bepaald, op een soortgelijke wijze als in dierproef 2 (dierproef 4). Hiervoor zijn donor dieren nodig van de knock-out muizen waarin de OA en RA modellen zijn geïnduceerd. Naast een effect van de signaal stoffen op de absolute hoeveelheden van de twee monocyte subsets kunnen deze signaal stoffen ook een effect hebben op de pro-inflammatoire capaciteit van de monocyte subsets.
- Simultaan aan dierproef 3 en 4 zal de lokale effecten van de signaal stoffen worden onderzocht. Naast een systemisch effect in het BM en milt kunnen de signaal stoffen ook een lokaal effect (in het gewricht) hebben op de infiltratie van de twee verschillende monocyte subsets. Dit zal worden onderzocht middels lokale injecties in het kniegewricht van de signaalstoffen.
- De lokale effecten van de signaal stoffen op de migratie van de monocyte subsets zal ook worden onderzocht middels cel tracking studies. Hier zal de migratie van Ly6C-high en -low monocyten worden onderzocht door monocyten te isoleren en te labelen en deze in knock-out muizen met experimentele OA en RA te injecteren en in vivo te imagen (dierproef 6).

### **Het inhiberen van monocyte subsets middels het toedienen van een biological welke aangrijpt op een target eiwit aanwezig op de monocyte subsets om zo gewrichtsschade in experimentele OA en RA te beperken.**

- Daarnaast zal worden gekeken wat de functionele rol/aandeel is van monocyte infiltratie in de uiteindelijke ontsteking en gewrichtsschade in de OA en RA modellen door middel van het systemisch depletieren van monocyten middels injecties van clodronaat gevulde liposomen of liposomen gevuld met een ander cytotoxische stof (dierproef 7). Hiermee kan worden bepaald of en welk potentieel het therapeutisch blokkeren van monocyte infiltratie heeft op de ontwikkeling van OA en RA.
- Tevens zal de potentie van het inhiberen van monocyte subsets middels het toedienen van een biological die aangrijpt op een target eiwit op de monocyte subset worden getoetst (dierproef 8). Eerst zal de ontwikkeling van OA en RA worden gevolgd in knock-out muizen waar het target eiwit niet aanwezig is, waarna het effect van de biological zal worden getoetst.

Alle dierproeven kunnen simultaan van elkaar worden uitgevoerd, aangezien de uitvoering niet afhankelijk is van data uit andere proeven. De keuze van de te onderzoeken signaal stoffen en knock-out muizen wordt niet alleen gebaseerd op de uitkomst uit andere proeven, maar wordt ook bepaald door voortschrijdend inzicht in vakliteratuur en andere experimenten binnen onze afdeling tijdens de looptijd van deze aanvraag. Mocht een knock-out model of een ziektenmodel geen veranderingen laten zien in de monocyte compositie of monocyte functionaliteit dan zal deze signaal-stof of ziektemodel niet meer worden getoetst in volgende proeven. In proef 1 tot en met 7 is geen go-no go moment aanwezig aangezien het een enkel experiment betreft en geen sequentie van experimenten. Binnen proef 8 is er wel een go-no go moment aanwezig. Eerst zal het ziekteverloop in een knock-out muis, waar het target eiwit is uitgeschakeld, worden getest. Als dit succesvol blijkt te zijn zal worden overgegaan op het volgende experiment waarbij het target eiwit zal worden geblokkeerd d.m.v. een biological.

### **Dierproef 1**

Subsets van monocytën zullen worden bepaald middels FACS, op verschillende tijdstippen in het ziekteproces van twee experimentele OA modellen, te weten collagenase geïnduceerde osteoarthritis (CiOA) en destabilisatie van de mediane meniscus osteoarthritis (DMM OA), en in twee experimentele RA modellen, te weten antigeen geïnduceerde artritis (AIA) en chronische Streptococcus cel wand artritis (chronische SCW artritis). Daarnaast zal de ontwikkeling van de gewrichtsschade worden gevolgd op deze tijdstippen middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

CiOA is een model waarbij een relatief hoge graad van ontsteking plaatsvindt en daarom een uitermate geschikt model is voor inflammatoire OA. Bij DMM OA daarentegen ontwikkelt zich weinig ontsteking. De vergelijking tussen deze 2 OA modellen zal aantonen dat de infiltratie van monocytën ontstekings-afhankelijk is, en niet wordt geïnduceerd door bot en kraakbeenschade. In dierproef 2 tot en met 8 zal daarom het DMM OA model niet meer worden gebruikt indien dit inderdaad bevestigd wordt.

AIA en chronische SCW artritis zijn twee RA modellen waarin het innate immuun systeem een grote rol speelt. Anders dan CIA, een andere gangbaar RA model waar het innate immuun systeem een belangrijke rol speelt, zal bij AIA en SCW slechts in het geïnduceerde gewricht RA ontwikkelen, dit is belangrijk om de mate van monocyte infiltratie juist te kunnen interpreteren. AIA en chronische SCW artritis verschillen van elkaar in de wijze van inductie, AIA wordt systemisch geïmmuniseerd terwijl chronisch SCW artritis alleen lokaal wordt geïnduceerd, welke mogelijk verschillen in monocyte infiltratie/functie als gevolg kan hebben.

Monocyte populaties zullen op verschillende tijdstippen worden geanalyseerd, deze gegevens zullen worden gebruikt om de meest geschikte tijdstippen voor dierproef 2 tot en met 8 te bepalen, dit om het aantal benodigde dieren te minimaliseren.

### **Dierproef 2**

Muizen waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyte subsets waarin worden geïsoleerd uit bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals mRNA expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses.

Alleen met monocytën afkomstig van muizen met experimentele OA en RA kan de functionaliteit van de monocyte subsets worden bepaald gedurende de verschillende fasen van het ziekteproces, aangezien deze pro-inflammatoire karakteristieken plastisch zijn en kunnen verschillen tijdens verschillende fasen in het ziekteproces. Deze assays kunnen niet worden nagebootst met cellijnen, aangezien er geen muizen monocyte cellijn bestaat.

### **Dierproef 3**

CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin een bepaalde signaal stof (b.v. ██████████, ██████████ etc.) niet aanwezig is. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse, ontsteking met behulp van in vivo imagen en pijn middels gait analyse. Deze knock-out muismodellen zullen een accuraat beeld geven van de mogelijke systemische effecten van de signaal stoffen op monocyte infiltratie in de beschreven OA en RA modellen.

### **Dierproef 4**

Knock-out muizen waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyte subsets zullen worden geïsoleerd uit bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses. Alleen met monocytën afkomstig van de knock-out muizen met experimentele OA en RA kan de rol van deze signaal stoffen op de functionaliteit van de monocyte subsets worden bepaald gedurende de verschillende fases van het ziekteproces, aangezien deze pro-inflammatoire karakteristieken plastisch zijn en kunnen verschillen tijdens verschillende fasen in het ziekteproces. Deze assays kunnen niet worden nagebootst met cellijnen, aangezien er geen muizen monocyte cellijn bestaat.

#### **Dierproef 5**

In naïeve controle en knock-out muizen (waarin geen OA of RA wordt geïnduceerd) zal herhaaldelijk signaal stoffen (b.v. ██████████ etc.) in het kniegewricht worden ingespoten, waarna de infiltratie van monocyte subsets in het kniegewricht zal worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse, ontsteking middels in vivo imaging en pijn middels gait analyse. Alleen door lokale injecties in het kniegewricht van knock-out muizen is het mogelijk een systemisch effect van de ingespoten signaal stoffen uit te sluiten en zo alleen de lokale effecten van de signaal stoffen te bepalen.

#### **Dierproef 6**

In controle en knock-out muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd zullen op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) gelabelde Ly6C-high en -low monocytën worden toegediend om de migratie van deze cellen in vivo te kunnen tracken middels in vivo imaging technieken op verschillende tijdstippen na toediening. De Ly6C-high en -low monocytën zullen worden geïsoleerd uit donor muizen waarna ze in vitro zullen worden gelabeld. Alleen zo kunnen de effecten van de signaal stoffen op de kinetiek van monocyte migratie en infiltratie tijdens experimentele OA en RA worden onderzocht.

#### **Dierproef 7**

Muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, worden voor en tijdens de fase van monocyte infiltratie (zie dierproef 1), herhaaldelijk systemisch geïnjecteerd met clodronaat gevulde liposomen (of een ander cytotoxische stof). Dit zal leiden tot een systemisch depletie van alle monocytën over een langere tijd. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS en de gewrichtsschade middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Alleen met herhaaldelijk injecteren van cytotoxische liposomen is het mogelijk om over langere tijd beide monocyte subsets te depletieren (Sunderkötter et al., J. Immunol., 2004). Alleen op deze manier is het mogelijk een uitspraak te doen welk potentieel het therapeutisch blokkeren van monocyte infiltratie heeft op de ontwikkeling van OA en RA, alvorens over te gaan op het daadwerkelijk blokkeren van monocyte infiltratie met een biological (zie dierproef 8).

#### **Dierproef 8**

Uit resultaten van dierproef 1 tot en met 7 zal een target eiwit betrokken bij de migratie en infiltratie van de monocyte subsets worden vastgesteld. CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin dit target eiwit ontbreekt. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS en de gewrichtsschade middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.



Daarna zullen muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, voor en tijdens de fase van monocYTE infiltratie (zie dierproef 1), herhaaldelijk geïnjecteerd worden met een biological die het target eiwit inhibeert. Waarna op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) de monocYTE subsets geanalyseerd zullen worden middels FACS en de gewrichtsschade middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

De keuze welk biological (antilichaam, mimetic etc.) gebruikt zal worden zal bij de start van de dierproef gemaakt worden om zo de meest geavanceerde compound te kunnen gebruiken op dat moment.

---

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

---

Dierproef 1 en 2 hebben ten doel om de 2 monocYTE subsets te beschrijven tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA. In dierproef 1 zullen de hoeveelheden monocYten worden bepaald in verschillende weefsels tijdens de ontwikkeling van OA en RA. In dierproef 2 zullen de functionele aspecten van deze monocYten worden bepaald waardoor het mogelijk is om de data van dierproef 1 juist en functioneel te kunnen interpreteren.

Dierproef 3, 4, 5 en 6 hebben ten doel om de rol van signaal stoffen in de migratie van monocYTE subsets in experimentele OA en RA vast te stellen. In dierproef 3 zullen de hoeveelheden monocYten worden bepaald in verschillende weefsels van knock-out muizen, waar de signaal stof niet functioneel is, tijdens de ontwikkeling van OA en RA. Zo kan worden vastgesteld of deze signaal stof mogelijk een systemisch effect heeft op monocYTE migratie tijdens OA en RA. In dierproef 4 zullen de functionele aspecten van deze knock-out monocYten worden bepaald waardoor het mogelijk is om de data van dierproef 3 juist en functioneel te kunnen interpreteren. In dierproef 5 zal worden onderzocht of de signaal stoffen ook aangrijpen op het kniegewricht zelf, waarbij het lokaal de infiltratie van monocYten stimuleert. Dit zal worden onderzocht middels lokale injecties van de signaal stoffen in knock-out muizen waarin geen OA of RA is geïnduceerd. In dierproef 6 zal de kinetiek van monocYTE migratie worden onderzocht in knock-out muizen met OA en RA, middels injectie van ex-vivo gelabelde monocYten gevolgd door in-vivo imaging. Hiermee kan de snelheid en mate van monocYTE migratie worden bepaald in de afwezigheid van bepaalde signaal stoffen.

Dierproef 7 en 8 hebben ten doel om te toetsen of het inhiberen van monocYTE subsets middels het toedienen van een biological, welke aangrijpt op een target eiwit aanwezig op de monocYTE subsets, de pathologie tijdens experimentele OA en RA kan verminderen. In dierproef 7 zal worden onderzocht of depletie van alle monocYten überhaupt een verlaging van de pathologie veroorzaakt. Als dit het geval blijkt te zijn kan worden overgegaan op dierproef 8, waar eerst in knock-out muizen, waar het target eiwit niet functioneel is, de pathologie van OA en RA zal worden gevolgd om na te gaan of dit een geschikt target is. Daarna zal een biological die aangrijpt op het target eiwit worden toegediend waarmee zal worden getracht de gewrichtsschade in experimentele OA en RA te verminderen.

---

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	Kinetiek van monocYTE subsets tijdens experimentele OA en RA
2	Functionele analyse van monocYTE subsets tijdens experimentele OA en RA
3	Kinetiek van monocYTE subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA
4	Functionele analyse van monocYTE subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA

Serial number	Type of animal procedure
5	Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen
6	Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocyten in knock-out muizen met experimentele OA en RA
7	Systemische monocyte depletie tijdens experimentele OA en RA
8	Inhiberen van monocyte infiltratie tijdens experimentele OA en RA middels targeting van monocyte subsets



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen  
p/a  
Geert Grooteplein 10  
6500 HB NIJMEGEN  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015115  
**Bijlagen**  
2

Datum 12-05-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 mei 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015115. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.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.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen  
KvK-nummer: 41055629  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]@radboudumc.nl

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]@radboudumc.nl

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Functie: Instantie voor dierenwelzijn  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]@radboudumc.nl

Gegevens gemachtigde

Adres: Geert Groteplein 10  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

**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: 8 juni 2015  
Geplande einddatum: 8 mei 2020  
Titel project: Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentale o  
Titel niet-technische samenvatting: Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentale o  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ( [REDACTED] )  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**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:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 8 mei 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen  
p/a  
Geert Grooteplein 10  
6500 HB NIJMEGEN  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015115  
**Bijlagen**  
2

Datum 12-05-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 12 mei 2015  
Vervaldatum: 11 juni 2015  
Factuurnummer: 201570115

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015115	€ 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.



## DEC-advies

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-0014
2. Titel van het project: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartitis en reumatoïde artritis.
3. Titel van de NTS: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartitis en reumatoïde artritis.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: RUDEC
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]@radboudumc.nl
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 17-02-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 03-03-2015
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking van 13-03-2015 tot 08-04-2015 en van 20-04-2015 tot 20-04-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 20-04-2015
  - advies aan CCD: 08-05-2015
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: 13-03-2015
  - Strekking van de vragen: De onderzoekers worden gevraagd de niet-technische samenvatting op bepaalde punten te herformuleren, de verwachte ernst te beschrijven en te screenen op spelfouten, weglatingen etc. Voorts worden de onderzoekers gevraagd de hoofddoelstelling duidelijker te formuleren, het aantal benodigde dieren beter te onderbouwen door toevoeging van het beoogde experimentele design, en beter toe te lichten wanneer er wel en wanneer er geen pijnbestrijding wordt toegepast en dit te onderbouwen. Verder worden de onderzoekers gevraagd of er een alternatief mogelijk is voor het tweemaal kort na elkaar toedienen van FCA, en of dit niet tot veel ongerief voor de dieren leidt. Andere

vragen betreffen kleine, soms slechts tekstuele, wijzigingen in de vergunningaanvraag.

- Datum antwoord: 08-04-2015
  - Strekking van het antwoord: De onderzoekers zijn het eens met de opmerkingen van de DEC over de niet-technische samenvatting, en hebben deze aangepast. De hoofddoelstelling is preciezer geformuleerd, het experimentele design met het aantal benodigde dieren is per dierproef toegevoegd, en de omstandigheden waarin wel of geen pijnbestrijding wordt toegepast zijn beter onderbouwd. De onderzoekers lichten toe dat zij ervaren hebben dat in de beoogde muizenstam dubbele FCA injecties niet leiden tot negatieve effecten op de huid. Het hiermee gepaard gaande ongerief is volgens de onderzoekers dus goed ingeschat.
  - Datum: 20-04-2015
  - Strekking van de vragen: De onderzoekers worden gevraagd duidelijker te formuleren wanneer er wel en wanneer er geen pijnbestrijding zal worden toegepast.
  - Datum antwoord: 20-04-2015
  - Strekking van het antwoord: De onderzoekers hebben de genoemde formulering aangepast.
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.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk *"Het vaststellen en karakteriseren van infiltrerende Ly6C-high en Ly6C-low monocyten in het aangedane gewricht tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA, het bepalen welke signaal stoffen uit het aangedane gewricht een rol spelen in de infiltratie van Ly6C-high en Ly6C-low monocyten, en het toetsen of inhibitie van deze signaal stoffen zal leiden tot een*

*vermindering van ontsteking en gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA*". Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Wetenschappelijk gezien is dat van belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan een beter begrip van de rol die deze monocyten spelen bij het ontstaan en verergeren van de gewrichtsontsteking in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van therapie gericht op monocyten duidelijk. Beide ziektebeelden zijn invaliderend en hebben een hoge prevalentie in de bevolking. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor deze ziektebeelden, wat resulteert in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC acht de aanvrager competent op dit gebied. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de rol van monocyten in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen, en mogelijke nieuwe aangrijpingspunten voor behandeling van deze ziektebeelden bij mensen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het welzijn van de dieren wordt aangetast door angst, pijn, en stress als gevolg van de volgende handelingen: intra-artculaire injecties onder anesthesie, tweemaalige subcutane injecties met zoutoplossing of Freund's Complete Adjuvant onder anesthesie, het doorsnijden van de mediane meniscus van één knie in een operatie onder anesthesie, imagen onder anesthesie, en verbloeden onder terminale anesthesie. Bovendien zal ongeveer de helft van de dieren pijn en hinder ondervinden van de gewrichtsontstekingen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties en het imagen in als licht, het ongerief als gevolg van de operatie schat de commissie in als matig, evenals het ongerief veroorzaakt door de gewrichtsontstekingen. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De rol van monocyten in osteoarthritis en reumatoïde artritis kan alleen in een proefdier worden onderzocht. Aangezien het immuunsysteem van muizen in grote mate overeenkomt met het immuunsysteem van mensen, zijn de behaalde resultaten relevant voor de behandeling van patiënten met osteoarthritis en reumatoïde artritis.
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, ondermeer doordat de onderzoekers gebruik zullen maken van een power analyse. De onderzoekers hebben modellen voor gewrichtsontsteking met weinig variatie in pathologie gekozen, zodat er zo min mogelijk dieren nodig zijn om betrouwbare resultaten te behalen. In de eerste dierproef wordt het optimale tijds punt bepaald om de gewrichtsontsteking te bestuderen, zodat in de daarop volgende dierproeven kan worden volstaan met één tijds punt. Op deze manier worden onnodige dierproeven voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 6700 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Indien mogelijk zullen de onderzoekers pijnbestrijding toepassen. Alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel. De dieren

worden dagelijks gecontroleerd en zullen worden gedood indien zij teveel ongerief ervaren. De DEC is er van overtuigd dat de onderzoekers de dierproeven zo humaan mogelijk uitvoeren. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging. Bij de dierproeven wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het ongerief voor 55% van de dieren is licht, en voor 45% van de dieren matig.

Tegenover deze nadelige gevolgen voor de dieren staat dat met dit onderzoek belangrijke inzichten kunnen worden verkregen in de rol van monocyten bij het ontstaan en in stand houden van gewrichtsontsteking in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde arthritis bij muizen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor patiënten met osteoarthritis en reumatoïde arthritis. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. De beoogde gezondheidswinst en kostenreductie zijn voldoende groot dat naar het oordeel van de commissie de nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, ethisch aanvaardbaar zijn.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

**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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Kinetiek van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA

## 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.

---

Subsets van monocyten zullen worden bepaald middels FACS, op verschillende tijdstippen in het ziekteproces van twee experimentele OA modellen, te weten collagenase geïnduceerde osteoarthritis (CiOA) en destabilisatie van de mediane meniscus osteoarthritis (DMM OA), en in twee experimentele RA modellen, te weten antigeen geïnduceerde artritis (AIA) en chronische Streptococcus cel wand artritis (chronische SCW artritis). Daarnaast zal de ontwikkeling van de gewrichtsschade worden gevolgd op deze tijdstippen middels histologische analyse en de expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (BM, milt, bloed en synovium) (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocyten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocyten

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

---

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

---

CiOA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

DMM OA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 de mediane meniscus van de rechterknie chirurgisch door te snijden onder anesthesie. Als controle groep voor de DMM OA muizen worden bij muizen op dag 0 een sham operatie in de rechterknie uitgevoerd onder anesthesie.

AIA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe in het gewricht worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en

analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester). Op 3 nader te bepalen tijdstippen tijdens de ontwikkeling van CiOA, DMM OA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 52 voor DMM OA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Er is gekozen om de 2 monocyt subtypes te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocyt tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet-aangedane linker knie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linker knie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Verder is gekozen om op 4 tijdstippen muizen te offeren om zo de periode in de ontwikkeling van elk model te bepalen waarbij de monocyt infiltratie het sterkst is, deze gegevens zullen worden toegepast in dierproef 2 tot en met 8 om daar de juiste tijdstippen te bepalen.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijkt dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model



wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén, niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat hiervoor een ontstekingsreactie nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 2 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

## B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

**Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.**

**Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 4 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 3 (tijdstippen) = 552 muizen.**

**Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 4 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 40 muizen.**

**Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 4 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 40 muizen.**

**In totaal zijn voor het huidige experiment 552 + 40 + 40 = 632 muizen geschat.**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	632	8-20 weken oud

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

### C. Re-use

---

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

---

No

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

---

### D. Replacement, reduction, refinement

---

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

---

#### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

#### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

#### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

---

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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.

---

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het chirurgisch doorsnijden van de mediane meniscus (DMM), het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect**

**hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **chirurgisch doorsnijden van de mediane meniscus onder anesthesie**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het chirurgisch doorsnijden van de mediane meniscus (DMM), het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

#### **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.

---

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont.  
Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

---

Indicate the likely incidence.

---

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

#### **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 ).

---

Matig

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

**L. Method of killing**

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA
Serial number	Type of animal procedure					
2	Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA					



## 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.

---

Muizen waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyte subsets zullen worden geïsoleerd uit BM, milt, bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals mRNA expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (BM, milt, bloed en synovium) (FACS)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten

De cellen die met FACS worden geïsoleerd zullen worden gebruikt voor verdere ex-vivo en in vitro analyses, daarom is het niet nodig om een extra groep mee te nemen voor de histochemische analyse van bot en kraakbeenschade.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

---

CiOA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op een nader te bepalen tijdstip (wanneer monocyte gehalte het hoogst is in het bloed, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de

inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Verder is gekozen om op 1 tijdstip (wanneer de monocYTE infiltratie het sterkst is) de muizen te offeren om zo het aantal dieren te beperken.

---

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren ( $n$ ) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ( $1-\beta$ ) en het gewenste significantieniveau ( $\alpha$ ). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 2 gekozen om slechts 1 tijdstip te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

---

## B. The animals

---

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

---

Onderzoek naar de rol van monocYten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie en 3 in vitro incubaties wordt geschat dat monocyten van 3 muizen gepooled moeten worden en dat 6 data punten nodig zijn. Dit leidt tot:  $3 \times 6 \times 4$  (RNA/3 x in vitro) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 432 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment  $432 + 30 + 30 = 492$  muizen geschat.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	492	8-20 weken oud

### 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.

### Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast

## **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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## **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.

---

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

## **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.

---

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

---

Indicate the likely incidence.

---

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

## **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 ).

---

Matig

## 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.

---

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Kinetiek van monocyte subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA

## 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.

---

CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin een bepaalde signaal stof (b.v. [redacted] etc.) niet aanwezig is. Hierbij moet worden gedacht aan bijvoorbeeld [redacted] knock-out muizen. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse, expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR, ontsteking met behulp van in vivo imagen en pijn middels gait analyse. Deze knock-out muismodellen zullen een accuraat beeld geven van de mogelijke systemische effecten van de signaal stoffen op monocyte infiltratie in de beschreven OA en RA modellen.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocyten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocyten.

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

---

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op twee nader te bepalen tijdstippen (wanneer monocyte aantallen het hoogst zijn in bloed, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten

tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een aparte groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen en of deze parameters in knock-out muizen is afgenomen. Verder is gekozen om op 3 tijdstippen muizen te offeren om het aantal dieren te beperken

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 3 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 3 gekozen om 2 tijdstippen te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

## B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen om de rol van bepaalde eiwitten in de migratie van monocytten te kunnen bepalen.

**Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.**

**Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijdstippen) = 276 muizen.**

**Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**In totaal zijn voor het huidige experiment  $276 + 30 + 30 = 336$  muizen geschat.**

**Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 336 wild-type en 1008 knock-out muizen aangevraagd.**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	336	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	1008	8-20 weken oud

## 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.

##### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

##### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

##### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

---

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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.

---

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

## 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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

### **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 ).

Matig

## **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.

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

| 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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA
Serial number	Type of animal procedure					
4	Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

In knock-out muizen die in dierproef 3 zijn onderzocht en waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyt subtypes zullen worden geïsoleerd uit bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyt subtypes in verschillende weefsels (FACS)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocyt (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyt subtypes in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocyt

De cellen die met FACS zullen worden geïsoleerd zullen worden gebruikt voor verdere ex-vivo en in vitro analyses, daarom is het niet nodig om een extra groep mee te nemen voor de histochemische analyse van bot en kraakbeenschade.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyt in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking,

en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

---

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op een nader te bepalen tijdstip (wanneer monocytgehalte het hoogst is in het bloed, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Er is gekozen om de 2 monocyt subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een aparte groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen en of in de knock-out muizen een verlaging is opgetreden. Verder is gekozen om op 1 tijdstip de muizen te offeren om zo het aantal dieren te beperken.

---

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 4 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 4 gekozen om 1 tijdstip te analyseren, om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyt migratie. Daarom is besloten om aparte



controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

## B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen om de rol van bepaalde eiwitten in de migratie van monocytten te kunnen bepalen.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie en 1 in vitro incubatie wordt geschat dat monocytten van 3 muizen gepooled moeten worden en dat 6 data punten nodig zijn.

Dit leidt tot:  $3 \times 6 \times 2$  (RNA/in vitro)  $\times$  3 (OA/RA modellen)  $\times$  2 (experimentele/controle groep) = 216 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse)  $\times$  3 (OA/RA modellen)  $\times$  2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging)  $\times$  3 (OA/RA modellen)  $\times$  2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment  $216 + 30 + 30 = 276$  muizen geschat.

Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 276 wild-type en 828 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	276	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	828	8-20 weken oud

## 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.

##### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocyte infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

##### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocyte infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyte migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

##### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

---

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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.

---

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

## **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.

---

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

---

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

---

### **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 ).

Matig

## **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.

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 5	Type of animal procedure Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen



## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

In naïeve controle en knock-out muizen (waarin geen OA of RA wordt geïnduceerd) zal herhaaldelijk signaal stoffen (b.v. ██████████ etc.) in het kniegewricht worden ingespoten, waarna de infiltratie van monocyte subsets in het kniegewricht zal worden geanalyseerd middels FACS, expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR, de gewrichtsschade middels histologische analyse, ontsteking middels in vivo imaging en pijn met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen. Hiermee kan ook worden bepaald of de lokale injectie van de signaal stoffen niet zal leiden tot een verhoogde serum levels, hiermee kan een mogelijk systemisch effect van de geïnjecteerde stof worden uitgesloten.

Het is niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

---

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

---

Naïeve wild type en naïeve knock-out muizen zullen herhaaldelijk intra-articulair (i.a.) in de rechterknie geïnjecteerd worden met signaal stoffen

( [REDACTED] etc.), terwijl in de linkerknie saline wordt geïnjecteerd, welke zal dienen als controle. De muizen zullen maximaal 7 injecties ontvangen, waarna de muizen worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Om de ontsteking na injectie van de signaal stoffen te kunnen volgen zal bij een groep wild type en knock-out muizen de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn na injectie van de signaal stoffen te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Er is gekozen om de linkerknie waar saline ingespoten wordt als controle te nemen aangezien er geen systemische effecten van de lokale injecties van signaal stoffen in de rechterknie wordt verwacht. Hiermee kan het aantal proefdieren worden beperkt. Om een systemisch effect inderdaad uit te sluiten zullen de serum levels van de ingespoten stof worden bepaald in deze muizen.

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren ( $n$ ) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ( $1-\beta$ ) en het gewenste significantieniveau ( $\alpha$ ). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door  $\alpha$  te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen om de linker knie waar saline ingespoten wordt als controle te nemen aangezien er geen systemische effecten van de lokale injecties van signaal stoffen in de rechter knie wordt verwacht. Hiermee kan het aantal proefdieren worden beperkt.

## B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen om de rol van bepaalde eiwitten in de migratie van monocytten te kunnen bepalen.

**Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.**

**Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (signaal stoffen) = 69 muizen.**

**Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (signaal stoffen) = 15 muizen.**

**Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (signaalstoffen) = 15 muizen.**

**In totaal zijn voor het huidige experiment 69 + 15 + 15 = 99 muizen geschat.**

**Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 99 wild-type en 297 knock-out muizen aangevraagd.**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	99	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	297	8-20 weken oud

## 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.

---

##### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocyte infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

##### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocyte infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyte migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

##### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is

verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

---

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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

---

### **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.

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

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

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

Er zal geen matig ongerief plaatsvinden aangezien geen OA of RA model zal worden geïnduceerd. De injecties van de signaal stoffen zullen slechts leiden tot een milde ontsteking en niet tot ernstige bot of kraakbeenschade. Samen met de korte experimentele periode kan het ongerief op licht worden geïndiceerd.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Er zal geen inductie van een OA of RA model plaatsvinden, hierdoor zal geen matig ongerief plaatsvinden.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

#### **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.

---

| 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 ).

---

Licht

## **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.

---

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

| 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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>6</td><td>Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocyten in knock-out muizen met experimentele OA en RA</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	6	Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocyten in knock-out muizen met experimentele OA en RA
Serial number	Type of animal procedure					
6	Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocyten in knock-out muizen met experimentele OA en RA					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

In controle en knock-out muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd zullen op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) gelabelde Ly6C-high en -low monocytten worden toegediend om de migratie van deze cellen *in vivo* te kunnen tracken middels *in vivo* imaging technieken op verschillende tijdstippen na toediening. De Ly6C-high en -low monocytten zullen worden geïsoleerd uit donor naieve en knock-out muizen waarna ze *ex vivo* zullen worden gelabeld. Alleen zo kunnen de effecten van de signaal stoffen op de kinetiek van monocyte migratie en infiltratie tijdens experimentele OA en RA worden onderzocht.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van (gelabelde) monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS en *in vivo* imaging)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht *in vivo* tijdens de ontwikkeling van ziekte (*in vivo* imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 natuurlijk aanwezige monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten

De aanwezigheid van de *ex vivo* gelabelde monocytten in het lichaam kunnen non -invasief gemonitord worden met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging.

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

---

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Na inductie van CiOA, AIA en chronische SCW artritis zullen de muizen een injectie van ex vivo gelabelde Ly6C-high en -low monocyten (fluorescent of radioactief) toegediend krijgen onder anesthesie, op een tijdstip wanneer de monocyte gehalte het hoogst is in het bloed (zie dierproef 1). De Ly6C-high en -low monocyten zijn afkomstig van donor dieren.

Op maximaal 5 nader te bepalen tijdstippen na injectie van de gelabelde cellen zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden ge-imaged middels optical of nuclear imaging technieken onder anesthesie. Na de laatste scan zullen de muizen niet bijkomen uit anesthesie maar zullen worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Er is gekozen om de monocYTE migratie te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocYten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen.

---

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 6 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

---

## B. The animals

---

---

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

---

Onderzoek naar de migratie van monocytten in gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

**Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.**

**Voor FACS en imaging van synovium en histologie van synovium zijn 15 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 15 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 90 muizen.**

**Als bron voor de monocytten die ge-imaged zullen worden zijn donor dieren nodig, hiervoor wordt geschat dat 50 muizen nodig zijn.**

**Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**In totaal zijn voor het huidige experiment  $90 + 50 + 30 + 30 = 200$  muizen geschat.**

**Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 200 wild-type en 600 knock-out muizen aangevraagd.**

<b>Species</b>	<b>Origin</b>	<b>Maximum number of animals</b>	<b>Life stage</b>
Muis	Charles River/Janvier	200	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	600	8-20 weken oud

---

**C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

### C. Re-use

---

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

---

No

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

---

### D. Replacement, reduction, refinement

---

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

---

#### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

#### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

#### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

---

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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.

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**



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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

## 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.

---

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

---

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

---

### **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 ).

Matig

## **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.

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 7	Type of animal procedure Systemische monocyte depletie tijdens experimentele OA en RA

## 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.

---

Muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, worden herhaaldelijk systemisch geïnjecteerd met clodronaat gevulde liposomen (of liposomen met een andere cytotoxische stof). Dit zal leiden tot een systemisch depletie van alle monocytten over een langere tijd. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse en expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten. Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses. Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR. De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

---

CiOA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Na inductie van CiOA, AIA en chronische SCW artritis zal een deel van de muizen maximaal 8 injecties van clodronaat gevulde liposomen (of liposomen gevuld met een andere cytotoxische stof) ontvangen. De periode waarin deze injecties zullen plaatsvinden zal worden bepaald naar aanleiding van de resultaten van dierproef 1 en zullen de periode omvatten wanneer monocyte migratie en infiltratie plaatsvindt. Injectie van deze liposomen heeft als gevolg dat in het bloed monocyten voor een lange tijd gedepleteerd zullen zijn; Ly6C-high monocyten voor 2 dagen en Ly6C-low monocyten voor 7 dagen (Sunderkötter et al., J Immunol., 2004).

Op een nader te bepalen tijdstip na de laatste clodronaat liposoom injectie zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis om het effect van monocyte depletie op de gewrichtsschade te kunnen bepalen.

Er is gekozen om de 2 monocYTE subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocYten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerKnie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerKnie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen en of deze parameters door de clodronaat liposoom behandeling is afgenomen. Verder is gekozen om op 2 tijds punten muizen te offeren om zo de hoeveelheid proefdieren te beperken.

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 7 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 7 gekozen om 2 tijds punten te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerKnie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

## B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocyten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

**Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.**

**Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijdstippen) = 276 muizen.**

**Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**In totaal zijn voor het huidige experiment  $276 + 30 + 30 = 336$  muizen geschat.**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	336	8-20 weken oud

## 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.

##### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocyte infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

##### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocyte infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyte migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

##### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk

ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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?

---

## G. Location where the animals procedures are performed

---

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.

---

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

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

---

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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

## 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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont.  
Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

### **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 ).

Matig

## **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.

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 8	Type of animal procedure Inhiberen van monocyte infiltratie tijdens experimentele OA en RA middels targeting van monocyte subsets

## 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.

---

Uit resultaten van dierproef 1 tot en met 7 zal een target eiwit betrokken bij de migratie en infiltratie van de monocyte subsets worden vastgesteld. CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin dit target eiwit ontbreekt. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse en expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Daarna zullen muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, voor en tijdens de fase van monocyte infiltratie (zie dierproef 1), herhaaldelijk systemisch geïnjecteerd worden met een biological die het target eiwit inhibeert. Waarna op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) de monocyte subsets geanalyseerd zullen worden middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse en expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten. Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses. Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait



analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

---

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen (waarin het target eiwit niet functioneel is) geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op een nader te bepalen tijdstip (wanneer monocYTE infiltratie het sterkst is, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren van wild-type en knock-out muizen worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren van wild-type en knock-out muizen worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Hierop volgend zal een experiment worden uitgevoerd waarin een biological tegen het target eiwit herhaaldelijk zal worden ingespoten in wild-type muizen waarin CiOA, AIA en SCW artritis zijn geïnduceerd en in naïeve wild-type muizen over een periode wanneer actieve monocyte migratie plaatsvindt (zie dierproef 1). Op een nader te bepalen tijdstip na de laatste injectie van de biological zullen zowel experimentele dieren als naïeve dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een aparte groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of deze parameters door de biological behandeling of in de target eiwit knock-out muizen is afgenomen. Verder is gekozen om op 2 tijdstippen muizen te offeren om zo de hoeveelheid proefdieren te beperken.

---

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

---

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt:  $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ( $1-\beta$ ) en het gewenste significantieniveau ( $\alpha$ ). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door  $\alpha$  te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 8 gekozen om 2 tijdstippen te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyt migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

## **B. The animals**

---

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

---

Onderzoek naar de rol van monocyten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

**Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.**

**Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3(OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijdstippen) = 276 muizen.**

**Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.**

**In totaal zijn voor het huidige experiment 276 + 30 + 30 = 336 muizen geschat.**

**Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de knock-out muis, derhalve worden 336 wild-type en 336 knock-out muizen aangevraagd.**

**Voor het tweede experiment waarbij een biological wordt toegediend is het aantal dieren als volgt geschat.**

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijds punten) x 2 (biological/controle) = 552 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (biological/controle) = 60 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (biological/controle) = 60 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment 552 + 60 + 60 = 672 muizen geschat.

In totaal worden er 1008 (336+672) wild-type en 336 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	1008	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	336	8-20 weken oud

### 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.

---

### **Vervanging**

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

### **Vermindering**

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

### **Verfijning**

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

---

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

---

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn en zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

## 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.

---

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

## 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.

---

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

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

---

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

---

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

**Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:**

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**
  
- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

---

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

---

**De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.**

**Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.**

**Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.**

**Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.**

## **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.

---

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

---



---

Indicate the likely incidence.

---

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

### **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 ).

---

Matig

## **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.

---

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

Radboud Universiteit Nijmegen  
p/a  
Geert Grooteplein 10  
6500 HB NIJMEGEN  


**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**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015115

Datum 15 mei 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 12 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoïde artritis" met aanvraagnummer AVD103002015115. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Niet technische samenvatting**

De niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat moeilijk taalgebruik, zeker bij punt 3.1. Daarnaast verwijst u bij 4.4 naar het projectvoorstel. De NTS moet echter zelfstandig leesbaar zijn, dus verwijzen naar het projectvoorstel is niet mogelijk.

Graag ontvangen wij een aangepaste niet technische samenvatting.

**Strategie en tijdsplan**

De onderlinge afhankelijkheid van de verschillende dierproeven is voor ons niet helder. Kunt u een tijdsplan aangeven wanneer welke proeven uitgevoerd worden? Daarnaast vragen wij u aan te geven welke proeven afhankelijk zijn van andere proeven en dus na elkaar uitgevoerd moeten worden.

Kunt u ook de go-no go momenten beschrijven binnen iedere dierproef, en of voor iedere dierproef alle vier de ziektemodellen uitgevoerd moeten worden? Op basis van welke informatie worden keuzes voor vervolgstappen gebaseerd?

Kunt u van de dierproeven waar knock-out muizen worden gebruikt (dierproef 3 t/m 6), aangeven waarop u de keuze voor de 3 knock-out muizen baseert?

**Projectvoorstel**

In het projectvoorstel staat in 3.4.1 over dierproef 3 "Deze data zullen aantonen dat ...". Wij nemen aan dat u hiermee bedoelt dat deze data een uitspraak kunnen doen óf lokale ontstekingen via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben.

In de Beschrijving Dierproeven staat aangegeven hoeveel dieren u wilt gebruiken voor de proeven. Hierbij is een berekening gemaakt waarop de aantallen naar boven zijn afgerond. Kunt u onderbouwen waarom u de aantallen naar boven afrondt?

**Datum**

15 mei 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015115

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

**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. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Wanneer een beslissing**

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

**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).

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



## 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 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="0"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]@radboudumc.nl</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]@radboudumc.nl	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]@radboudumc.nl																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]@radboudumc.nl</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]@radboudumc.nl	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]@radboudumc.nl																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.
- Functie Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling [redacted]
- Telefoonnummer [redacted]
- E-mailadres instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
- 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 08 . 06 . 2015
- Einddatum 08 . 06 . 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele o
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele o
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [redacted]
- E-mailadres [redacted]

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € 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
- DEC-advies, document factuurgegevens


## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

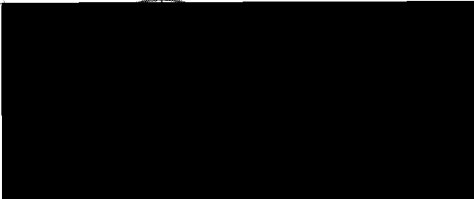
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie Instantie voor dierenwelzijn

Plaats Nijmegen

Datum 08 - 05 - 2015

Handtekening 





Central Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Radboud universitair medisch centrum  
[Redacted]

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Huispost 34

Geert Groteplein zuid 8

Route 444

T [Redacted]

F [Redacted]

[Redacted]  
www.radboudumc.nl

Datum  
27 mei 2015

Ons kenmerk

Pagina  
1 van 3

KvK 41055629/4

Uw kenmerk

Contactpersoon

Onderwerp

Aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven AVD103002015115

Geachte commissieleden,

Geachte voorzitter,

Naar aanleiding van uw oordeel over het onderzoeksplan zoals beschreven in de aanvraag "Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartritis en reumatoïde artritis" (AVD103002015115) wil ik hierbij uw vragen/opmerkingen graag nader toelichten.

#### **Niet-technische samenvatting**

- U schrijft dat in de niet-technische samenvatting moeilijk taalgebruik wordt gehanteerd, met name in punt 3.1, en dat er in de NTS geen verwijzing naar het projectvoorstel mogelijk is.

*Hierop hebben wij het taalgebruik in de NTS op meerder punten aangepast en punt 3.1 is in zijn geheel herschreven. Daarnaast is in punt 4.4 de verwijzing naar het projectvoorstel verwijderd.*

#### **Strategie en tijdsplan**

U heeft een aantal vragen aangaande de strategie en tijdsplan van de beschreven studies in het projectvoorstel.

- Wat is het tijdsplan wanneer de proeven worden uitgevoerd?
- Welke proeven zijn afhankelijk van andere proeven en worden daardoor na elkaar uitgevoerd?

*Proeven 1 tot en met 8 kunnen simultaan van elkaar worden uitgevoerd, de uitvoering is niet afhankelijk van data van andere proeven. De keuze van de te onderzoeken signaal stoffen en knock-out muizen wordt niet*

*direct afgeleid uit voorgaande experimenten. Deze keuze wordt ook gebaseerd op de huidige kennis in de literatuur en door voortschrijdend inzicht in de literatuur of uit experimenten uitgevoerd door onszelf. Zo ligt op dit moment de focus op [REDACTED] als signaal stof, maar deze kan de komende jaren verschuiven naar andere signaalstoffen en dit is niet perse afhankelijk van eerder uitgevoerde proeven. Mocht een knock-out muis geen effect laten zien, dan zal deze signaal stof ook niet verder worden getoetst in de andere experimenten.*

*Alle 8 proeven kunnen in principe simultaan worden uitgevoerd, echter is het wel logisch om eerst de kinetiek en fenotype van monocytten (proef 1 t/m 4) te beschrijven voordat kan worden overgegaan tot het blokkeren van een signaal stof met een biological (proef 8).*

- Beschrijf go-no go momenten binnen iedere dierproef?
- Welke informatie bepaald de keuze voor vervolgstappen?

*Binnen proef 1 tot en met 7 zijn geen duidelijk go-no go momenten aanwezig, de proeven beschrijven een enkel experiment en niet een sequentie van experimenten. Tevens zijn er geen momenten waarbij de experimenten eerder kunnen worden beëindigd. Binnen experiment 8 is er wel een go-no go moment aanwezig. Eerst zal het ziekteverloop in een knock-out muis, waar het target eiwit is uitgeschakeld, worden getest. Als dit succesvol blijkt te zijn zal worden overgegaan op het volgende experiment waarbij het target eiwit zal worden geblokkeerd d.m.v. een biological.*

- Dient voor elke dierproef alle 4 ziektemodellen uitgevoerd te worden?

*In principe willen we alle beschreven ziektemodellen toetsen zoals zij staan beschreven in het projectvoorstel. Mocht een model geen monocyste infiltratie of functionele verschillen in monocyste populaties laten zien tijdens de ontwikkeling van het ziektebeeld dan zal dit model ook niet worden getoetst in. Dit wordt verwacht voor het DMM model in proef 1, derhalve staat het DMM model ook niet meer vermeld in proef 2 tot en met 8.*

- Waarop wordt de keuze voor de 3 knock-out muizen gebaseerd?

*De keuze van het knock-out model dat wordt onderzocht wordt gebaseerd op de huidige kennis in literatuur, maar ook door voortschrijdend inzicht tijdens de komende jaren binnen vakliteratuur, de resultaten uit het huidige projectvoorstel en resultaten van andere onderzoeken binnen onze afdeling. Op dit moment staan [REDACTED] centraal in onze vraagstelling (zie 3.1 van het projectvoorstel). Derhalve is de [REDACTED] muis waarschijnlijk het eerste knock-out model dat getest zal worden.*

Deze informatie is samengevat toegevoegd aan 3.4.1. in het project voorstel.

#### **Projectvoorstel**

- U vraagt of met de zin "Deze data zullen aantonen dat..." in 3.4.1 wordt bedoeld dat deze data een uitspraak kunnen of lokale ontsteking via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben.

*Dit is inderdaad correct. Het effect van het ontbreken van een signaal stof die specifiek tijdens een ontsteking vrij komt op de aanmaak van Ly6C-high en -low monocytten in het beenmerg en de milt zal*

Datum  
27 mei 2015

Ons kenmerk

Pagina  
3 van 3

*duidelijkheid geven of lokale ontsteking via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben op het been merg of milt.*

- U vraagt ons te onderbouwen waarom de aantallen proefdieren per studie naar boven zijn afgerond.

*In onderdeel B1 wordt per studie een berekening gegeven waarmee het maximaal aantal proefdieren wordt geschat. Wij hebben aanvankelijk deze schatting naar boven afgerond aangezien een geschatte maximaal aantal dieren wordt gevraagd. Deze interpretatie is inderdaad niet juist. De berekening in onderdeel B1 geeft al het geschatte maximaal aantal dieren weer en dient niet naar boven afgerond te worden. Derhalve is het projectvoorstel aangepast en zijn de hoeveelheden die berekend zijn in onderdeel B1 van elke studie doorgevoerd in de gehele aanvraag inclusief de NTS. In totaal worden nu 6448 muizen aangevraagd in plaats van 6700.*

Alle aanpassingen zoals hierboven beschreven zijn opgenomen in de aanvraag en deze aangepaste aanvraag is bijgevoegd.

Met vriendelijk groet,

[Redacted signature]

[Redacted email address]@radboudumc.nl





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

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

T 0900-2800028 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD103002015115

Datum 29 juni 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

**Bijlagen**

1

Op 12 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoide arthritis" met aanvraagnummer AVD103002015115. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 juni 2015 heeft u de Niet-technische Samenvatting, het Projectvoorstel en de Beschrijving Dierproeven aangevuld.

### **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 "Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoide arthritis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 29 juni 2015 tot en met 8 juni 2020.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd d.d. 8 mei 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.

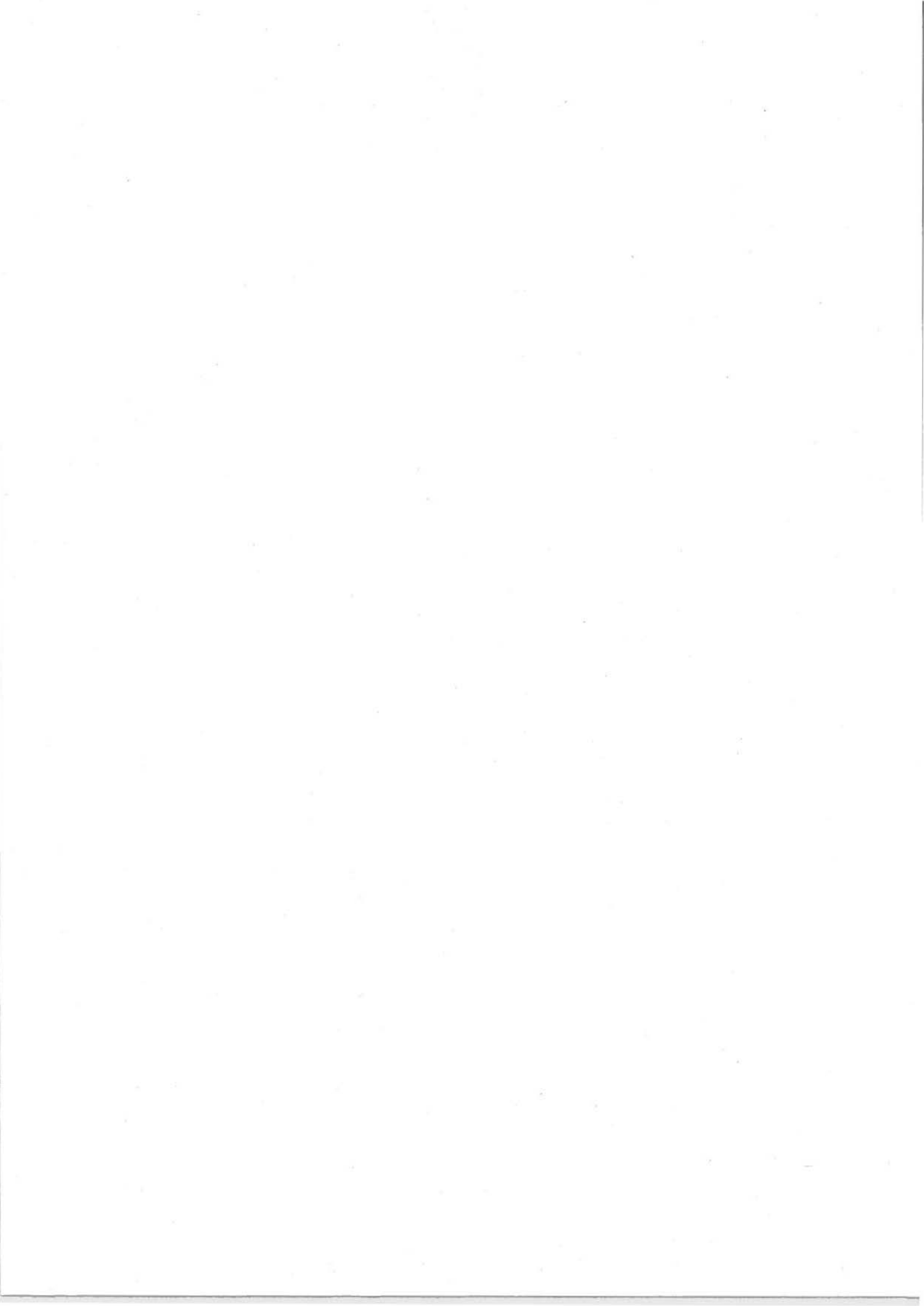
Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

### **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.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,

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Adres: Postbus 9101  
Postcode en woonplaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 juni 2015 tot en met 8 juni 2020, voor het project "Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartritis en reumatoïde artritis" met aanvraagnummer AVD103002015115, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 mei 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals digitaal ontvangen op 8 juni 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals digitaal ontvangen op 8 juni 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 8 mei 2015, ontvangen op 8 mei 2015.

### Dierproeven

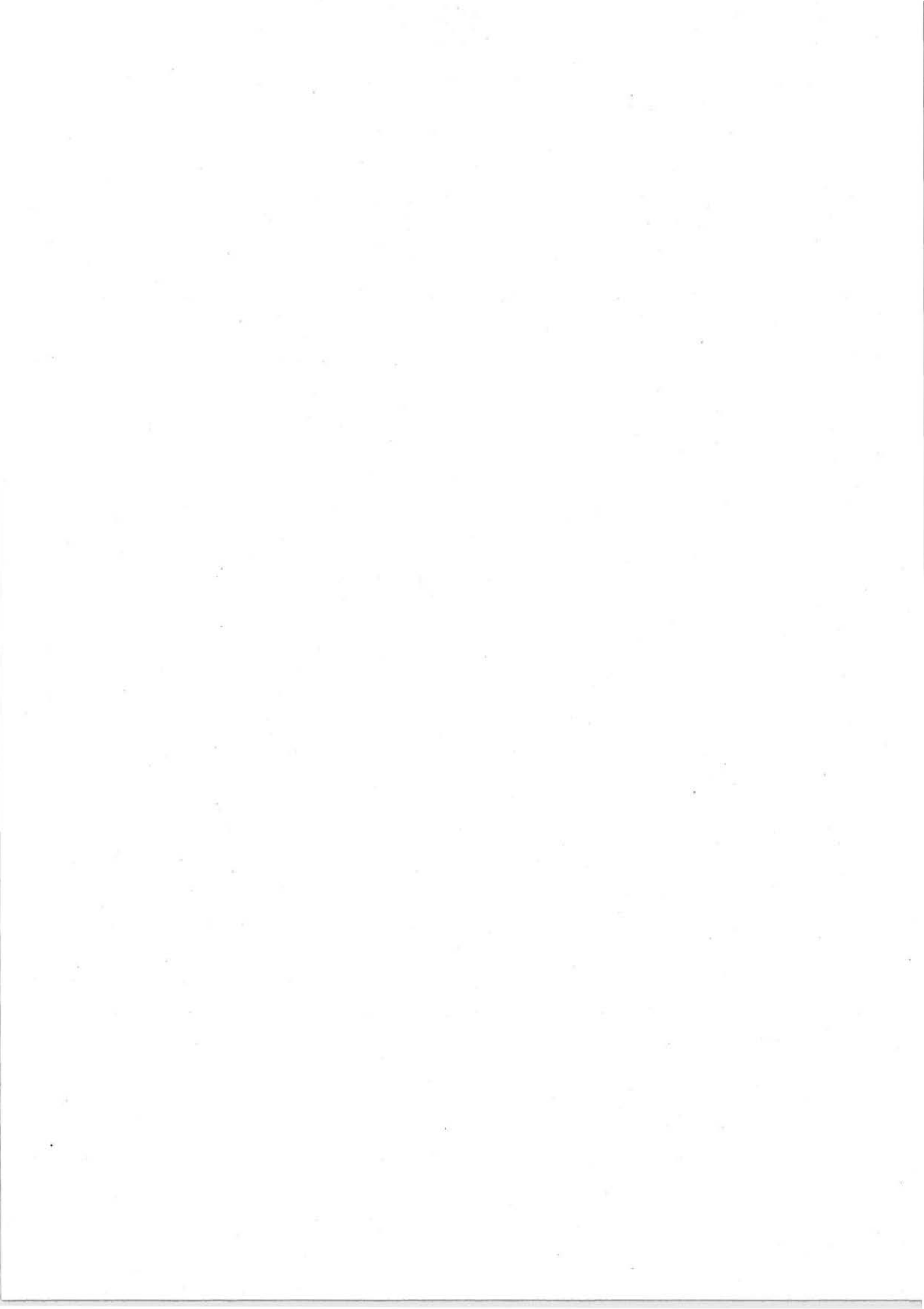
Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Kinetiek van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA	Muizen	632	Matig
Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA	Muizen	492	Matig
Kinetiek van monocyte subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA	Muizen Knock-out muizen	336 1008	Matig
Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA	Muizen Knock-out muizen	276 828	Matig
Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen	Muizen Knock-out muizen	99 297	Licht
Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocyten in knock-out muizen met experimentele OA en RA	Muizen Knock-out muizen	200 600	Matig
Systemische monocyte depletie tijdens experimentele OA en RA	Muizen	336	Matig
Inhiberen van monocyte infiltratie tijdens experimentele OA en RA middels targeting van monocyte subsets	Muizen Knock-out muizen	1008 336	Matig

### Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarden dat

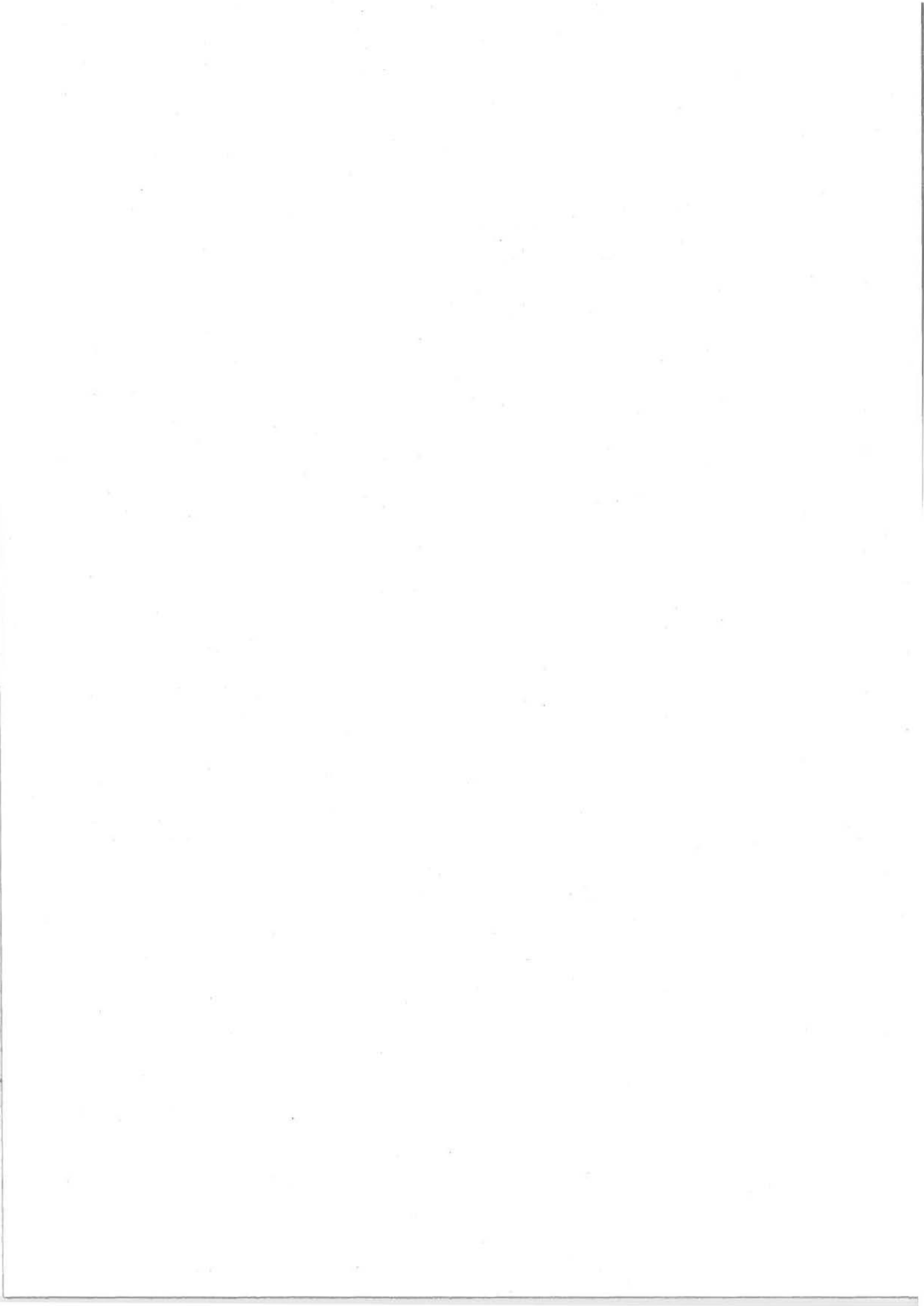
- Voor aanvang van dierproef 8 dient eerst de kinetiek en fenotype van monocyten uit dierproef 1 t/m 4 worden beschreven;
- In dierproef 8 het go-no go moment voor het target eiwit en de invulling van het volgende experiment, wordt afgestemd met de IvD.



**Datum**  
29 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015115

- 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 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving 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.



**Datum**

29 juni 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD103002015115

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.

**Locatie**

De dierproeven worden (niet allemaal) verricht in een inrichting van een gebruiker volgens artikel 10g van de wet.



## DEC-advies

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-0014
2. Titel van het project: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartitis en reumatoide artritis.
3. Titel van de NTS: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartitis en reumatoide artritis.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: RUDEC
  - telefoonnummer contactpersoon [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 17-02-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 03-03-2015
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking van 13-03-2015 tot 08-04-2015 en van 20-04-2015 tot 20-04-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 20-04-2015
  - advies aan CCD: 08-05-2015
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: 13-03-2015
  - Strekking van de vragen: De onderzoekers worden gevraagd de niet-technische samenvatting op bepaalde punten te herformuleren, de verwachte ernst te beschrijven en te screenen op spelfouten, weglatingen etc. Voorts worden de onderzoekers gevraagd de hoofddoelstelling duidelijker te formuleren, het aantal benodigde dieren beter te onderbouwen door toevoeging van het beoogde experimentele design, en beter toe te lichten wanneer er wel en wanneer er geen pijnbestrijding wordt toegepast en dit te onderbouwen. Verder worden de onderzoekers gevraagd of er een alternatief mogelijk is voor het tweemaal kort na elkaar toedienen van FCA, en of dit niet tot veel ongerief voor de dieren leidt. Andere

vragen betreffen kleine, soms slechts tekstuele, wijzigingen in de vergunningaanvraag.

- Datum antwoord: 08-04-2015
  - Strekking van het antwoord: De onderzoekers zijn het eens met de opmerkingen van de DEC over de niet-technische samenvatting, en hebben deze aangepast. De hoofddoelstelling is preciezer geformuleerd, het experimentele design met het aantal benodigde dieren is per dierproef toegevoegd, en de omstandigheden waarin wel of geen pijnbestrijding wordt toegepast zijn beter onderbouwd. De onderzoekers lichten toe dat zij ervaren hebben dat in de beoogde muizenstam dubbele FCA injecties niet leiden tot negatieve effecten op de huid. Het hiermee gepaard gaande ongerief is volgens de onderzoekers dus goed ingeschat.
  - Datum: 20-04-2015
  - Strekking van de vragen: De onderzoekers worden gevraagd duidelijker te formuleren wanneer er wel en wanneer er geen pijnbestrijding zal worden toegepast.
  - Datum antwoord: 20-04-2015
  - Strekking van het antwoord: De onderzoekers hebben de genoemde formulering aangepast.
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.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk *"Het vaststellen en karakteriseren van infiltrerende Ly6C-high en Ly6C-low monocyten in het aangedane gewricht tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA, het bepalen welke signaal stoffen uit het aangedane gewricht een rol spelen in de infiltratie van Ly6C-high en Ly6C-low monocyten, en het toetsen of inhibitie van deze signaal stoffen zal leiden tot een*

*vermindering van ontsteking en gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA*". Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Wetenschappelijk gezien is dat van belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan een beter begrip van de rol die deze monocytën spelen bij het ontstaan en verergeren van de gewrichtsontsteking in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van therapie gericht op monocytën duidelijk. Beide ziektebeelden zijn invaliderend en hebben een hoge prevalentie in de bevolking. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor deze ziektebeelden, wat resulteert in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC acht de aanvrager competent op dit gebied. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de rol van monocytën in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen, en mogelijke nieuwe aangrijpingspunten voor behandeling van deze ziektebeelden bij mensen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het welzijn van de dieren wordt aangetast door angst, pijn, en stress als gevolg van de volgende handelingen: intra-articulaire injecties onder anesthesie, tweemaalige subcutane injecties met zoutoplossing of Freund's Complete Adjuvant onder anesthesie, het doorsnijden van de mediane meniscus van één knie in een operatie onder anesthesie, imagen onder anesthesie, en verbloeden onder terminale anesthesie. Bovendien zal ongeveer de helft van de dieren pijn en hinder ondervinden van de gewrichtsontstekingen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties en het imagen in als licht, het ongerief als gevolg van de operatie schat de commissie in als matig, evenals het ongerief veroorzaakt door de gewrichtsontstekingen. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De rol van monocytën in osteoarthritis en reumatoïde artritis kan alleen in een proefdier worden onderzocht. Aangezien het immuunsysteem van muizen in grote mate overeenkomt met het immuunsysteem van mensen, zijn de behaalde resultaten relevant voor de behandeling van patiënten met osteoarthritis en reumatoïde artritis.
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, ondermeer doordat de onderzoekers gebruik zullen maken van een power analyse. De onderzoekers hebben modellen voor gewrichtsontsteking met weinig variatie in pathologie gekozen, zodat er zo min mogelijk dieren nodig zijn om betrouwbare resultaten te behalen. In de eerste dierproef wordt het optimale tijdstip bepaald om de gewrichtsontsteking te bestuderen, zodat in de daarop volgende dierproeven kan worden volstaan met één tijdstip. Op deze manier worden onnodige dierproeven voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 6700 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Indien mogelijk zullen de onderzoekers pijnbestrijding toepassen. Alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel. De dieren

worden dagelijks gecontroleerd en zullen worden gedood indien zij teveel ongerief ervaren. De DEC is er van overtuigd dat de onderzoekers de dierproeven zo humaan mogelijk uitvoeren. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging. Bij de dierproeven wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het ongerief voor 55% van de dieren is licht, en voor 45% van de dieren matig.

Tegenover deze nadelige gevolgen voor de dieren staat dat met dit onderzoek belangrijke inzichten kunnen worden verkregen in de rol van monocytten bij het ontstaan en in stand houden van gewrichtsontsteking in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde arthritis bij muizen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor patiënten met osteoarthritis en reumatoïde arthritis. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. De beoogde gezondheidswinst en kostenreductie zijn voldoende groot dat naar het oordeel van de commissie de nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, ethisch aanvaardbaar zijn.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

[Redacted]

**Van:** [Redacted]@radboudumc.nl  
**Verzonden:** dinsdag 16 juni 2015 13:39  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** RE: AVD103002015115  
**Bijlagen:** 2015-0014 Factuurinformatie.pdf

**Categorieën:** [Redacted]

Beste mevrouw [Redacted]

Nu staan nog steeds de facturatiegegevens niet op de rekening erbij vermeld. Ik heb hier al een paar keer contact over gehad met de CCD. Op deze manier kan de factuur niet verwerkt worden bij de afdeling financiële administratie van het RadboudUMC.

Ik hoor graag wat er gedaan kan worden om dit op te lossen, aangezien het de betalingen onnodig vertraagt.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

---

Van: ZBO-CCD [ZBO-CCD@minez.nl]  
Verzonden: dinsdag 16 juni 2015 13:08  
Aan: [Redacted]  
Onderwerp: RE: AVD103002015115

Beste mevrouw [Redacted]

Dit is een niet-versleutelde versie.  
Als het goed is lukt het nu wel.

Mocht u nog problemen hebben dan horen wij die graag.

Excuses voor het ongemak.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) Nationaal Comité advies dierproevenbeleid  
[www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl) .....

Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: [Redacted] [rvo.nl](http://rvo.nl)

Beste CCD,

Ik kan het document niet openen, kunt u een niet-versleutelde versie verzenden?

Alvast bedankt!

Met vriendelijke groet,

██████████

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

Verzonden: maandag 15 juni 2015 11:15

Aan: ██████████

Onderwerp: AVD103002015115

Geachte mevrouw ██████████

Deze brief is op 12 mei 2015 per post naar u toegezonden.  
Zie bijlage.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) Nationaal Comité advies dierproevenbeleid  
[www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl) .....

Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

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

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

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

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.

The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 1 juli 2015 16:53  
**Aan:** [REDACTED]@radboudumc.nl  
**Onderwerp:** Terugkoppeling besluit AVD103002015115

Geachte RUDEC,

U heeft advies uitgebracht over het project "Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoïde artritis". Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De voorwaarden waaronder de vergunning is verleend :

- Voor aanvang van dierproef 8 dient eerst de kinetiek en fenotype van monocyten uit dierproef 1 t/m 4 te worden beschreven
- In dierproef 8 wordt het go-no go moment voor het target eiwit en de invulling van het volgende experiment, afgestemd met de IvD.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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