

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015227								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlagen beschrijving dierproeven 1,2,3,4			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail aanvullende informatie 6-10-2015				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	
10	Mail beschikking 14-10-2015				x		x	x	

27 AUG. 2015



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl 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="1"> <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="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Grooteplein-Noord 9</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9102</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6525EZ 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 Grooteplein-Noord 9	Postbus	9102	Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein-Noord 9																
Postbus	9102																
Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Onderzoeker in opleiding</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]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker in opleiding		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker in opleiding																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <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>PhD student</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]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	PhD student		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD student																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- 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 25 . 09 . 2015
- Einddatum 25 . 09 . 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
- 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
- E-mailadres

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, factuurinformatie

6 Ondertekening

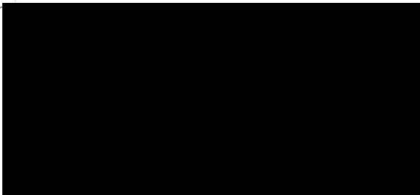
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende 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 

Plaats Nijmegen

Datum 25 - 08 - 2015

Handtekening 

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).
- 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. | Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes |

2 Categories

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

The annual average proportion of the US population with a musculoskeletal condition has increased from 28 percent to more than 33 percent of the population between 1996 to 1998 and 2009 to 2011 (U.S. Department of Health and Human Services, 1996-2011). Impaired bone regeneration is one of these musculoskeletal conditions. Bone possesses the intrinsic capacity for regeneration as part of the repair process in response to injury (Bates and Ramachandran, 2007; Einhorn, 1998). Bone is regenerated with its pre-existing properties largely restored, and with the newly formed bone being eventually indistinguishable from the adjacent uninjured bone (Einhorn, 1998). However, there are cases of fracture healing in which bone regeneration is impaired, such as delayed union or non-union. Additionally, there are conditions in which bone regeneration is required in large quantity, beyond the normal potential for self-healing, such as for skeletal reconstruction of large bone defects created by trauma, infection, tumor resection and skeletal abnormalities, or cases in which the regenerative process is compromised (Dimitriou et al., 2011), including osteoporosis and diabetes mellitus. In these cases, the bone defects have to be reconstructed surgically by use of bone grafting materials. Bone is the second most commonly implanted material in the human body, after blood transfusion (Marino and Ziran, 2010). The need for bone grafting procedures is increasing worldwide. The number of bone grafting procedures ranges from 0.5 million in the US to 2.2 million worldwide annually (Calori et al., 2011). This is amongst other causes due to systemic diseases that affect the bone regenerative capacity of the body in a negative way, predominantly being osteoporosis and diabetes mellitus. Various medical practitioners, for example in trauma surgery, plastic and reconstructive surgery, orthopedics and dentistry face the complexity of reconstructing bone defects every day.

Different bone regenerative treatments are currently clinically applied. Autografting, in which autologous bone is used to regenerate bone defects, is the mostly used and most well known procedure for bone regenerative treatment worldwide. The major disadvantage of autografting is the need for an additional surgical procedure and site to harvest donor bone. This autologous donor bone is commonly harvested from the crista iliaca, which is easily accessible and contains a relatively large amount of corticocancellous bone (Giannoudis et al., 2005). The harvest of autologous donor bone from the crista iliaca is associated with risk of gait disturbances, deviation in form, meralgia paresthetica (neuropraxia N. cutaneus femoralis lateralis), or herniation of intestines. An alternative treatment modality is the use of allograft bone, in which processed cadaver bone is transplanted into the patient. However, bone allograft is not always accepted as a substitute for several reasons, including (i) undesired graft-versus-host reactions, (ii) graft necrosis, (iii) delayed incorporation, and (iv) relatively high costs (Giannoudis et al., 2005). Finally, similar to autologous bone grafts, allografts suffer from limited availability (Banwart et al., 1995).

In view of the drawbacks of autologous and allogeneous bone grafts, synthetic bone graft materials have become heavily explored as alternatives. As synthetic graft materials are off-the-shelf available, a second surgical procedure to harvest autologous bone is not necessary and no donor site complications can occur. A variety of synthetic graft materials have been evaluated as scaffolds in bone repair, including the calcium phosphate (CaP) based bioactive ceramic hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (β -TCP), and biphasic calcium phosphate (BCP), bone cements, bioactive glasses, and biodegradable synthetic polymers (Gu et al., 2013). Among the synthetic graft materials, CaP-based bone substitute materials have been mostly explored. The main advantage of these materials is the excellent biocompatibility due to their chemical similarity to the natural mineral of bone tissue (Ruhé et al., 2006; Habraken et al., 2006). Their favorable biological performance is characterized by bioactivity (i.e. the capacity to directly bond to bone) and osteoconductive properties (i.e. to guide bone growth over their surface).

A major drawback of CaP-based bone substitute materials, however, is the generally poor degradation. Ideally, the degradation is balanced with new bone formation to warrant stability and mechanical strength during the regenerative phase. CaP-based bone substitute materials can be degraded by two parallel pathways: active resorption in a cell-mediated process, and passive resorption in an acellular process dependent on the chemical solubility of the material. Absence of adequate porosity of the material delays degradation and impedes cell ingrowth (Gauthier et al., 1998). Several approaches have been explored to introduce porosity and therefore improve degradability (Barralet et al., 2002; Habraken et al., 2008; Lopez-Heredia et al., 2012). This can be achieved by the addition of other materials that have a faster degradation rate than the cement (i.e. CaP cement (CPC)). When these materials degrade, a porous structure remains, allowing fluid flow throughout the cement and therefore improving degradation. These materials can be added in form of fast-degrading microparticles, e.g. made of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), that dissolve after cement setting (Ruhé et al., 2005; Habraken et al., 2008; Qi et al., 2008; Félix Lanao et al., 2011).

For clinical purposes, it is important that degradation can be controlled, predicted and monitored, and hence new bone formation can be regulated in healthy and compromised conditions (e.g. osteoporosis and diabetes mellitus (DM)). Particularly in elderly patients that already suffer from decreased regenerative capacity, additional compromised conditions that interfere with osteoblastic bone formation and/or osteoclastic bone resorption are likely to affect the biological performance of bone grafts. Osteoporosis and DM interfere drastically with bone regeneration, affecting general wound healing processes and the balanced bone homeostasis (Fuegl et al., 2011).

Osteoporosis: osteoporosis is the most common bone disease in the US. The prevalence is expected to intensify, as the population ages (Pei et al., 2015). Osteoporotic patients present an imbalance in the level of bone formation and resorption during bone remodeling, resulting in a reduced bone mineral density causing lower bone mass and deterioration of bone tissue micro-architectures (Fini et al., 2004). Therefore, bone healing around dental and orthopedic implants placed in osteoporotic patients is negatively influenced and more prone to implant failure (Alghamdi et al., 2014).

Diabetes mellitus: DM affects inflammatory processes that precede and are part of wound healing. Many studies performed in animal models, and in rat models in particular, suggest that insulin deficiency can result in decreased bone integrity. For instance, measurements of bone strength in DM models have revealed that DM and insulin deficiency can have a negative impact on bone strength and bone composition. In a long-term DM model, Einhorn et al. (1988) showed that diabetic bones display specific defects of bone mineralization, including decreased hydroxyapatite crystal perfection, decreased calcium-to-phosphate composition of the ash, and decreased ash content in certain bones such as the tibial metaphysis.

Osteoporotic and diabetic patients undergoing medicinal therapy may present a complex bone healing process, not necessarily positive or similar to the healthy condition (Iizuka et al., 2008; Hou et al., 2011). During fracture healing, the use of bisphosphonates (i.e. the most common anti-osteoporotic drug) or insulin (i.e. the general treatment modality for diabetic patients) is controversial because of the conflicting action of these medications on osteoclastic activity (Thomas et al., 1998; Schindeler et al., 2008). Osteoclasts are important for remodeling the callus into cortical bone (Einhorn et al., 1998) but insulin/bisphosphonate inhibits osteoclast-mediated bone resorption in order to prevent bone loss and improve bone strength (Thomas et al., 1998; Murakami et al., 1995).

For these reasons, it is necessary to address:

- The biological performance of CaP-based bone substitute materials (i.e. the degradation rate of these materials and replacement by new bone) under different health conditions;
- The specific mechanisms of bone response to the administered medication for DM and osteoporosis.

References

-U.S. Department of Health and Human Services, The Burden of Musculoskeletal Conditions in the United States, 1996-2011

- Bates P, Ramachandran M. *Basic Orthopaedic Sciences*. 2007:123-134
- Einhorn TA. *Clin Orthop Relat Res*. 1998, 355(Suppl):S7-21
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. *BMC Medicine*. 2011 9:66
- Marino JT, Ziran BH. *Orthop Clin North Am*. 2010 Jan;41(1):15-26
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamont C. *Injury, Int. J. Care Injured* 42 (2011) S56–S63
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36S, S20—S27
- Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 May 1;20(9):1055-60
- Gu Y, Huang W, Rahaman MN, Day ED. *Acta Materialia* 9 (2013) 9126-9136
- Ruhé PQ, Hedberg-Dirk EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. *Tissue Eng*. 2006 Apr;12(4):789-800
- Habraken WJ, Wolke JG, Mikos AG, Jansen JA. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006;17(9):1057-74
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. *Biomaterials* 19 (1998) 133-139
- Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR. *Biomaterials* 2002;23(15):3063-72
- Habraken WJ, Zhang Z, Wolke JC, Grijpma DW, Mikos AG, Feijen J, Jansen JA. *Biomaterials* 29 (2008) 2464-2476
- Lopez-Heredia MA, Sariibrahimoglu K, Yang W, Bohner M, Yamashita D, Kunstar A, van Apeldoorn AA, Bronkhorst EM, Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Itatani K, Yang F, Salmon P, Wolke JG, Jansen JA. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 404-414
- Ruhé PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA. *Inc. J Biomed Mater Res* 74A: 533–544, 2005
- Habraken WJ, de Jonge LT, Wolke JG, Yubao L, Mikos AG, Jansen JA. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008
- Qi X, Ye J, Wang Y. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1837-1845
- Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3459-3468
- Fuegl A, Tangl S, Keibl C, Watzek G, Redl H, Gruber R. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):524-9
- Pei M, Li J, McConda DB, Wen S, Clovis NB, Danley SS. *Bone* 78 (2015) 1-10.
- Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, Carpi A. *Biomed Pharmacother*. 2004 Nov;58(9):487-93
- Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. *Tissue engineering: Part C Volume 20, Number 6, 2014*.
- Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. *J Orthop Res*. 1988;6(3):317-23
- Iizuka T, Matsukawa M. *Climacteric*. 2008 Aug;11(4):287-95

-Hou CJ, Liu JL, Li X, Bi LJ. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Mar;41(3):400-7

-Thomas DM, Udagawa N, Hards DK, Quinn JM, Moseley JM, Findlay DM, Best JD. *Bone.* 1998 Sep;23(3):181-6

-Schindeler A, Ramachandran M, Godfrey C, Morse A, McDonald M, Mikulec K, Little DG. *J Orthop Res.* 2008 Jan;26(1):65-74.

-Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. *Bone.* 1995 Aug;17(2):137-44.

3.2 Purpose

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

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

The aim of this project is to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions). The aim of this project is achievable because of the knowledge of bone regenerative treatments and ceramics that is internationally gained in the past decades, on which this project is founded. An improvement in terms of biological performance of CaP-based bone substitute materials as we know them today is expected because of the ability to combine CaP-based bone substitute materials with fast-degrading materials that induce porosity (porogens) and therefore improve the degradation rate and the ability to combine CaP-based bone substitute materials with bone stimulating agents to improve the formation of new bone. Furthermore, achievement of this aim is supported by the fact that the CaP-based bone substitute materials that will be implanted *in vivo* were living up to the standards (i.e. ability to set, cohesive and easy to use) during *in vitro* testing before being implanted *in vivo* and that *in vivo* procedures (i.e. surgery) and histological analysis will be performed by researchers that have the available expertise.

3.3 Relevance

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

Research is necessary to develop treatment modalities that enable optimized degradation properties and accelerated degradation of synthetic CaP-based bone substitute materials to allow new bone formation. From a material perspective, these modalities have been explored by combining synthetic CaP-based matrices (e.g. CaP cement (CPC)) with fast-degrading materials as porogens (i.e. polymers, bioinorganics, other CaP-based

materials) and by combining synthetic CaP-based matrices with bone stimulating agents (e.g. bioinorganics). Pre-clinical studies provide further insight in the biological performance of these CaP-based bone substitute materials in an *in vivo* environment.

It is scientifically, as well as socially relevant to investigate the difference in biological performance of bone substitute materials in healthy and compromised conditions (i.e. conditions compromising bone regeneration – osteoporosis and diabetes mellitus) because these compromised conditions are likely to affect the biological performance of bone grafts, because of their interference with osteoblastic bone formation and/or osteoclastic bone resorption.

From a social perspective, once a reliable, controlled and compliant medical device for bone regeneration purposes can be made clinically available for healthy patients with bone defects as well as for patients with a compromised medical condition linked to impaired bone healing – such as the above mentioned patients with osteoporosis and diabetes – with bone defects, an increasing number of patients with dental, maxillofacial, orthopedic and spinal bone defects can benefit from this.

3.4 Research Strategy

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

The project is designed in such a way that the biological performance of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials can be evaluated on:

1. Efficacy in terms of biocompatibility of the developed CaP-based bone substitute material.
2. Efficacy in terms of controlled degradability of the developed CaP-based bone substitute material / new bone formation at the implant site in:
 - Healthy conditions
 - Compromised health conditions that will be treated (osteoporosis and diabetes mellitus)
3. Efficacy in terms of enhanced bone formation at the implant site by release of drugs (e.g. antibiotics) or substances that improve bone formation (e.g. bioinorganics) from the CaP-based bone substitute material.

The developed CaP-based bone substitute materials will be screened for biocompatibility and biological performance in healthy conditions and in osteoporotic or diabetic conditions that will be treated with medication, because this disease would also be treated in human patients. After screening, the long-term biological performance of the materials and performance of the materials in an animal bone model comparable to the human bone model will be evaluated. Efficacy in terms of accelerated degradability and new bone formation at the implant site will be evaluated in comparison to a legally marketed bone substitute.

Furthermore, release of drugs (e.g. antibiotics) or substances (e.g. bioinorganics) from the CaP-based bone substitute materials will be investigated to improve the material in terms of decreasing the infection risk of the surgical site and enhancing new bone formation, both improving and accelerating the healing of the bone defect.

Evaluation on degradation of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials and new bone formation at the implant site will consist of descriptive histology, quantitative histomorphometry and evaluation of sequential fluorochrome labeling.

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

All developed synthetic CaP-based bone substitute materials are tested *in vitro* on handling properties, (i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material) before they will be *tested in vivo*. In the *in vivo* studies, the biological performance of the CaP-based bone substitute materials will be evaluated using ectopic implantation of pre-set scaffolds and either orthotopic injection of CaP cements (CPCs) or orthotopic implantation of pre-set scaffolds in bone defect models. Efficacy of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials will be proven by evaluation of the implanted materials in various animal models:

- Ectopic implantation of the materials in rats to evaluate biocompatibility and the ability of ectopic bone formation.
- Orthotopic implantation of the materials, creating bone defects in healthy rats, rabbits and goats (in this specific order on the timeline of this project), making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model. The defects will be filled with the developed synthetic bone substitute material.
 - In healthy rats and rabbits bone defects will be created in the femora (bilaterally).
 - In goats bone defects will be created in the femora and iliac crests (bilaterally) and by performing sinus floor elevation procedures (bilaterally). All defects (including the sinus floor) will be filled with the developed CaP-based bone substitute material.
- Orthotopic implantation of the materials, creating bone defects in health compromised animal models. Achieving compromised conditions by inducing osteoporosis or diabetes. Health compromised conditions will be conditions in which a systemic disease (e.g. osteoporosis or diabetes) is chemically or surgically induced. In case of an animal model with a systemic disease, this disease will be treated with the appropriate drugs as would be done in humans.

The basic outline of the different components of this project will be as follows:

The first step of the *in vivo* research strategy (after *in vitro* testing) is screening of the developed synthetic bone substitute materials for biocompatibility and biological performance in healthy rats. This will be done by subcutaneous implantation (ectopic) and implantation in both

femoral condyles (orthotopic). Rats are the 'lowest animal species' suitable for testing bone substitutes. Simultaneously, bone substitute materials will be tested orthotopically in rats with treated osteoporosis or diabetes to evaluate their performance in terms of new bone formation in these conditions.

Appealing CaP-based bone substitute materials will then be tested in a rabbit femoral condyle model, allowing larger femoral condyle bone defects and long-term follow-up. This is necessary to evaluate the long-term performance of the implanted materials in a defect that is large enough to need a bone substitute material to heal and would not heal without a bone substitute material. The long-term follow-up time is based on the time point at which implantation time coincides with complete degradation of the material and new bone formation. In rabbits this is 26 weeks. Because of the difference in bone metabolic rate between smaller (rabbit) and larger animals, the rabbit animal model is the most suitable model for long-term follow up of the biological performance of bone substitute materials.

Making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model, goats are used to perform implantation of the most appealing CaP-based bone substitute materials orthotopically (i.e. femoral condyles, iliac crests and sinus floor elevation procedures). The goat is a suitable animal model for testing human implants and materials as they are considered to have a metabolic rate and bone-remodeling rate similar to that of humans (Anderson et al., 1999; Spaargaren, 1994). Bone healing capacity of goat bone is comparable with that of humans (Dai et al., 2005). The goat is also a suitable animal model because of the size and shape of the bones and similarity in loading properties. In rabbits this cannot be tested because of the differences in stance between the species (Pearce et al., 2007). The use of multiple implantation sites (i.e. different bones) will make it possible to compare the biological performance of the materials and bone response between implantation sites. The locations of the implants are chosen based on the similarity to the clinical situation in humans (i.e. sinus elevation procedures) and based on the easy accessibility of corticocancellous bone in these bones.

A component of this project is the focus on addition of drugs or substances to the CaP-based bone substitutes to further improve the materials in terms of diminishing the infection risk at the surgical site when released from the material and – as a result or as a direct effect – by accelerating degradation and concomitant new bone formation.

The developed synthetic bone substitute materials will be compared to a legally marketed bone substitute.

References

-Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, Dalmeijer RA, Leenders H, van Blitterswijk CA, Verbout AJ. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Jul;(364):231-9

-Spaargaren DH. *Acta Biotheor.* 1994 Dec;42(4):263-9

-Dai KR, Xu XL, Tang TT, Zhu ZA, Yu CF, Lou JR, Zhang XL. *Calcif Tissue Int.* 2005 Jul;77(1):55-61

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

The main goal of this project is to develop a synthetic CaP-based bone substitute material for clinical use in bone regeneration treatments. This synthetic bone substitute material should obey to clinical requirements, such as being safe for the patient, improving bone formation and having excellent handling properties to fit the work of the surgeon. To reach the main goal of this project, different components should be considered and tested in animal experiments.

First of all, the biological performance of the developed synthetic bone substitute material will be evaluated in rats, the 'lowest animal species' possible for research in bone regeneration and highly suitable for rapid screening of the biological performance. Simultaneously, biological performance in healthy rats will be compared to biological performance in health compromised conditions. When in rats one of the evaluated materials does not live up to the expected biological performance, this material in its current form will not be tested further in animals until it is adjusted.

When the material is showing the desired biological performance (accelerated degradation and enhanced bone formation at the implant site), the material will be tested for its long-term performance in rabbits, in which follow-up time coincides with complete degradation of the material and concomitant new bone formation.

The use of rats, rabbits and goats in this specific order (on the timeline of this project), makes an increase in the size of the defects possible and is providing an increase in similarity to the human bone model. Because of the latter, implantation of the developed CaP-based bone substitute materials in goats will provide pre-clinical results in terms of biological performance of the material most comparable to the clinical situation (i.e. in human). The release of drugs or substances that improve bone formation by direct or indirect effects will improve the material even further.

Following the different steps of this project will lead to the aim of this project: to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions).

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	Bone substitutes in healthy rats
2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats
3	Bone substitutes in healthy rabbits
4	Bone substitutes in healthy goats

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.
- 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 Bone substitutes in healthy rats

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.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism, specifically a mammal. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies (containing mammals) are required to investigate biological performance. Bone substitute materials will be investigated using two research lines: an ectopic (i.e. subcutaneous) implantation line and an orthotopic (i.e. femora bilaterally) implantation line. For each developed material, both lines should be investigated. Both lines can be investigated at the same time in the same rat, diminishing the number of rats needed. Ectopic implantation of the materials in rats is necessary to evaluate biocompatibility and the ability of ectopic bone formation (osteinductivity; bone formation without presence of surrounding bone). Orthotopic implantation of the materials is necessary to evaluate the biological performance in a bone defect, comparable to a clinical situation in which the bone can respond to the bone substitute material. This experimental approach leads to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

The smaller the animal, the higher the metabolic rate. Therefore, the metabolic rate of the animal determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment. Shorter implantation periods (i.e.

faster data sampling) are required in rats because of the fast healing (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 2 and 6 weeks (Renno et al., 2013), which allows comparison of the biological performance of the material in an early phase and a late phase of material degradation and bone regeneration. It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. The implantation periods are suitable for rapid screening of the developed bone substitute material for histocompatibility and biological performance in terms of accelerated degradability and new bone formation at the implant site in rats. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

References

-Stravopoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):55-65

-Renno AC, van de Watering FC, Nejadnik MR, Crovace MC, Zanotto ED, Wolke JG, Jansen JA, van den Beucken JJ. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5728-5739

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

- Bone defect surgery: bone substitute materials will be placed orthotopic (i.e. in the femora) and ectopic (i.e. subcutaneous) in healthy, skeletally mature rats under general anesthesia. A femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rats needed) and filled with one CaP-based bone substitute material per femur. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rats will receive painkillers. After the procedure, the rats will be housed in groups according to the housing standards. The rats will receive a normal diet and will have no special housing restrictions.
- Sacrifice: the rats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 2 or 6 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007).

For rapid screening of the biological performance of the bone substitute material, a small animal is the animal model of choice. Rats are the smallest and 'lowest' animal species suitable for bone regeneration studies. Furthermore, rats are ideal models to evaluate the performance of bone substitute materials for reasons of reliability, reproducibility, and accuracy in the obtained data.

A maximum of 12 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 6 rats are needed (i.e. 2 orthotopic and 2 ectopic implantation sites per rat) per implantation period. This means $12 \times 6 \times 2 = 144$ rats. A possible loss of up to 6 animals is taken into account. Therefore, 150 rats will be used in this part of the project. The number of rats in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rats will be skeletally mature Wistar rats from a EU-registered breeder.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	registered breeder	150	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

C. Re-use

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

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

 No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo. Bilateral defects will be created to reduce the total number of laboratory animals needed. Both lines can be investigated at the same time in the same rat, i.e. both ectopic and orthotopic implants, diminishing the number of rats needed.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication will be given to the animals.

- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

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.

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate.

An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

Its important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
8. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

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).

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

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.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femora for histological analysis.

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.
- 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>Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats
Serial number	Type of animal procedure					
2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats					

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.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The *in vitro* liquid environment is not relatable to an *in vivo* environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies (containing mammals) are required to investigate biological performance. We intent to compare the biological performance of a well-known bone substitute material under treated compromised and healthy conditions to gain a better understanding about how diabetes mellitus and osteoporosis and the medication used as a treatment for the diseases affect bone regeneration in a rat bone defect model for non-critical size defects.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

Furthermore, expression of surface markers, gene expression and cellular behavior will be analyzed using *in vitro* culture (e.g. osteoclastic activity). The smaller the animal, the higher the metabolic rate. Therefore, the metabolic rate of the animal determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment. Shorter implantation periods (i.e. faster data sampling) are required in rats because of the fast healing (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 4 and 12 weeks, which allows comparison of the bone response in healthy conditions and in conditions of disease/medication in an early phase (up to 4 weeks

in rats) and a late phase (up to 12 weeks in rats) of material degradation and bone regeneration (Alghamdi, 2013; Al-Zube, 2009; Kuchler, 2014). It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. The intention of this study is to gain a better understanding about how diabetes and osteoporosis and the medication used as a treatment for the diseases affect bone regeneration, in comparison to bone regeneration in healthy conditions, using a legally marketed bone substitute.

References

-Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Jun;20(6):493-505

-Al-Zube L, Breitbart EA, O'Connor JP, Parsons JR, Bradica G, Hart CE, Lin SS. *J Orthop Res*. 2009 Aug;27(8):1074-81

-Kuchler U, Keibl C, Fugl A, Schwarze UY, Tangl S, Agis H, Gruber R. *Clin Oral Implants Res*. 2015 May;26(5):485-91

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

- Induction of diabetes mellitus: diabetes mellitus will be induced by using streptozotocin and assess the condition by measuring blood glucose levels 1 week after induction (Fuegl et al., 2011). After confirmation of hyperglycemia, insulin will be given as a therapy.
- Induction of osteoporosis: osteoporotic conditions will be induced through orchidectomy and a special diet food, 6 weeks after orchidectomy (Alghamdi et al., 2014), the condition will be accessed using micro-CT scan and checking the BMD (bone mineral density). One week after bone defect surgery, an alendronate therapy will be installed.
The approach in both groups is based on previous research, in which diabetes mellitus and osteoporosis are successfully induced. Treatment is given to provide a situation as close to the situation in human patients.
- Bone defect surgery: when the compromised conditions are confirmed, a femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rats needed) and filled with bone substitute material. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rats will receive painkillers.

- Sacrifice: the rats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 4 or 12 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007). For rapid screening of the biological performance of the bone substitute material, a small animal is the animal model of choice. Rats are the smallest and 'lowest' animal species suitable for bone regeneration studies. Furthermore, rats are ideal models to evaluate the performance of bone substitute materials for reasons of reliability, reproducibility, and accuracy in the obtained data.

In this study there will be 3 groups:

1. Experimental group containing diabetic rats.
2. Experimental group containing osteoporotic rats. In both experimental groups the rats will be treated with the appropriate medication.
3. Control group containing healthy rats. This group is needed for comparison.

A maximum of 6 bone substitute materials will be analyzed in these groups (diabetic, osteoporotic and healthy rats). Per material a minimum of 6 rats are needed (i.e. 2 orthotopic implantation sites per rat) per implantation period. This means $6 \times 6 \times 2 = 72$ rats. A possible loss of up to 3

animals is taken into account. Therefore, 75 rats will be used in this part of the project. The number of rats in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rats will be skeletally mature Wistar rats from an EU-registered breeder. Wistar (Wister rats) is one of the most common strains used in studies for osteoporotic (orchidectomy) and diabetic (streptozotocin) induction.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	registered breeder	75	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: no replacement by lower animals or animal free techniques is available which mimic the biologic response requested for this experiment. However, the literature on the animal models of diabetes/osteoporosis is well accessible and the experimental protocols are well described; a high level of standardization and good comparison of experimental results between groups is possible.

Reduction: a sample size calculation was performed to provide the required number of animals to be used in this study. It is important to highlight that by using both legs we are also reducing the number of animals.

Refinement:

- Diabetes model: the model chosen is the quickest and less stressful diabetic induction model for the animal.
- Osteoporotic model: we will reduce the discomfort of invasive intervention (ORX and implantation) by performing the experiment under full anesthesia. Medication for pain will be given according to the anticipated pain after the intervention.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

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.

A literature search conducted in PubMed showed no results for this specific procedure.

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?

F. Accommodation and care

No

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

No difference in housing, however a low calcium food pellet is used for the ORX group until the time of the second surgery (implantation procedures), whereas the other animals receive normal food. The low calcium food is needed to establish effectively the osteoporotic condition.

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.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After induction of diabetic/osteoporotic conditions and the femoral bone defect, the area will initially present some redness, swelling and a possible bruise may be visible. The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. For diabetic animals loss of weight can cause an adverse effect on welfare. For the diabetic rats, also an impaired wound healing can cause an adverse effect on welfare.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures.

Another general adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.

To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

For diabetic animals loss of weight can cause an adverse effect on welfare. For the diabetic rats, also an impaired wound healing can cause an adverse effect on welfare. This will be watched carefully by the caretakers and researchers.

A low calcium diet is given to the Orchiectomy(ORX) group, which is not expected to influence animal behavior.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The animals will be observed on a daily basis and will be weighed on the day of diabetic/osteoporotic induction and bone defect surgery. Also at day 3 and 7 postoperatively/post induction, during the recovery period. Thereafter animals will be weighed weekly until the end of the experiment. In occurrence of unexpected clinical events, that cause distress and that are difficult or impossible to treat, they will be euthanized. The specific clinical signs include:

- Diabetic animals: rapid loss of weight (15-20%), prolonged diarrhea (3 days).
 - Further general HEP can be applied.
-

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

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).

All 3 groups are expected to present a *moderate level* of discomfort.

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.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femur for histological and genetic analysis.

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.
- 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 Bone substitutes in healthy rabbits

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.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate biological performance.

Bone substitute materials will be investigated through orthotopic (i.e. in the femora of the rabbits) implantation, leading to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

The metabolic rate of the animal, in this case the rabbit, determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 6 and 26 weeks, which allows comparison of the biological performance of the material in an early phase of material degradation and bone regeneration and on the long-term. In rabbits these are suitable implantation periods to have a reliable insight on the long-term performance of the bone substitute material (Rajesh et al., 1998; Choi et al., 2014), because 26 weeks is expected to coincide with complete material degradation and concomitant new bone formation at the implant site. It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there

will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

References

-Rajesh KS, Mohanty M, Varma BR, Bhat KM. *Indian J Dent Res.* 1998 Apr-Jun;9(2):59-65

-Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Honnami M, Ohba S, Echigo R, Sakai T, Igawa K, Suzuki S, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M. *J Artif Organs.* 2014 Dec;17(4):344-51

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

· Bone defect surgery: bone substitute materials will be placed orthotopic (i.e. in the femora) in healthy, skeletally mature rabbits under general anesthesia. A femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rabbits needed) and filled with one CaP-based bone substitute material per femur. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rabbits will receive painkillers. After the procedure, the rabbits will be housed in groups according to the housing standards. The rabbits will receive a normal diet and will have no special housing restrictions.

· Sacrifice: the **rabbits** will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 6 or 26 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc, Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

When the developed, experimental bone substitute material is showing promising biological performance in rats, the goal is to evaluate the long-term performance of the material in terms of complete material degradation and concomitant new bone formation. A promising biological performance means: degradation of the implant material (i.e. CaP-based bone substitute material) and new bone formation at the site of the degraded implant. Evaluation by descriptive histology and quantitative histomorphometry on bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material. Of the 12 materials tested in rats, a maximum of 9 materials (including one legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) that show the most promising biological performance will be tested in rabbits. The number of 9 materials is a maximum; when a material is not showing promising biological performance in rats, this material in its current form will not be tested in rabbits.

For injecting a synthetic bone substitute material, a certain width of the defect is necessary. Consequently rabbits are the smallest animals or 'lowest animal species' suitable for injectable bone filler testing. The long-term follow-up time is based on the time point at which implantation time coincides with complete degradation of the material and new bone formation. In rabbits this is 26 weeks. Because of the difference in bone metabolic rate between smaller (rabbit) and larger animals, rabbits are more suitable for long-term follow-up testing of the performance of bone substitute materials, because the long-term follow-up time point in smaller animals will be ahead of the long-term follow-up time point in larger animals.

A maximum of 9 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 4 rabbits are needed (i.e. 2 orthotopic implantation sites per rabbit) per implantation period. This means $9 \times 4 \times 2 = 72$ rabbits. A possible loss of up to 3 animals is taken into account. Therefore, 75 rabbits will be used in this part of the project. The number of rabbits in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rabbits will be skeletally mature, female, New Zealand white rabbits. The choice of the sex of the rabbits is female. Female rabbits are preferred for housing reasons (less aggressive compared to male rabbits).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
New Zealand white rabbit	registered breeder	75	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment.

All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo.

Bilateral defects will be created (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication and an antibiotic drug will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

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.

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

F. Accommodation and care

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.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rabbits. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized.

The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rabbits. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse effect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

It's important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
 2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
 3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
 4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
 5. Decrease in body weight of more than 20%.
 6. Severe self-mutilation due to distress.
 7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
 8. Severe decrease of motor function, causing distress.
-

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

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).

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

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.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femora for histological analysis.

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.
- 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 4	Type of animal procedure Bone substitutes in healthy goats

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.

Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate biological performance.

After showing promising results in the long-term follow-up study in rabbits, the most appealing bone substitute materials will be investigated in goats through orthotopic implantation in the femoral condyles and the iliac crests (bilaterally) and through filling of the sinus floor with the developed bone substitute material, leading to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

In this study, the implantation period will be 12 weeks, which is a suitable implantation period for larger animals to evaluate material degradation and bone regeneration (Hoekstra et al., 2012). Evaluation of degradation of the material in an early phase is not beneficial, because degradation is already confirmed in the study with the rabbit animal model. Instead, sequential fluorochrome labeling will make it possible to visualize the dynamics of bone growth in time. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material, making translation towards clinical application possible.

References

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

- Bone defect surgery: bone defects will be created and bone substitute materials will be placed orthotopic (femoral condyles, iliac crests and sinus floors) in skeletally adult goats under general anesthesia. All goats will undergo one surgical session. During surgery heart rate and the oxygen level in the blood of the goats will be monitored. During the surgery and post surgery, the goats will receive painkillers and an antibiotic drug. After the procedure, the goats will be housed according to the housing standards. Fluorochrome markers will be administered subcutaneously at 1, 3, 6 and 9 weeks post-surgery (Loozen et al., 2015; Hoekstra et al., 2012). To analyze auto-fluorescence after histological processing, one goat will be used as a control and will not receive the fluorochrome markers (Hoekstra et al., 2012).
- Sacrifice: the goats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 12 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc, Nijmegen. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Multiple implantation sites will be used to decrease the amount of animals needed to obtain the project's objectives. The femoral condyle and iliac crest models allow 4 experimental bone substitute materials. The sinus floor elevation procedure will be carried out in a split mouth design, allowing direct comparison of 2 materials; the experimental bone substitute material with a legally marketed bone substitute material.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007). Making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model, goats are used to perform implantation of the most appealing synthetic bone substitute formulations orthotopically (i.e. femoral condyles, iliac crests and sinus floor elevation procedures). The goat is a suitable animal model for testing human implants and materials as they are considered to have a metabolic rate and bone-remodeling rate similar to that of humans (Anderson et al., 1999; Spaargaren, 1994). Bone healing capacity of goat bone is comparable with that of humans (Dai et al., 2005). The goat is also a suitable animal model because of the size and shape of the bones and similarity in loading properties. In rabbits this cannot be tested because of the differences in stance between the species (Pearce et al., 2007).

Of the 9 materials tested in rabbits, a maximum of 4 materials (including one legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) that show the most promising long-term performance in terms of complete implant degradation of the implant material (i.e. CaP-based bone substitute material) and new bone formation at the site of the degraded implant will be tested in goats. Evaluation by descriptive histology and quantitative histomorphometry on bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of long-term performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

A maximum of 4 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 8 goats are needed. This means $4 \times 8 = 32$ goats. The number of goats in this study is based on achievement of the study objectives (to demonstrate a difference between the groups) with the lowest number of animals per group possible. The goats will be skeletally mature.

The same goat will be used for a bilateral sinus elevation procedure as well as for implantation in the femora and iliac crests bilaterally:

- The sinus floor elevation procedure will be carried out in a split-model design that allows direct comparison of the most appealing developed, experimental bone substitute material with a legally marketed bone substitute material. This procedure therefore only allows 2 bone substitute materials, one at each site. Each developed material should at least be tested in a sinus floor elevation procedure (i.e. similarity to the clinical situation in humans).
- The femoral condyle and iliac crest models allow 4 experimental materials. These implantation sites are used because of the possibility to

compare biological performance of the materials and bone response between implantation sites (i.e. different bones) and to diminish the number of goats needed (The goat animal model allows more materials to be tested in one goat) All materials will be implanted in one surgical session. As mentioned above, the implantation sites are chosen because of the similarity to the clinical situation in humans (i.e. sinus elevation procedures) and because of the possibility to compare biological performance of the materials and bone response between implantation sites (i.e. different bones). Other important factors to choose these implantation sites are:

- Easy accessibility of corticocancellous bone in these bones
- The femoral condyles as a constant factor (i.e. used in the rat and rabbit animal model)
- Similarity of the iliac crest bone model to the sinus floor elevation model, because of the two cortical layers of bone that enclose the corticocancellous bone.

This study will show the in vivo performance of the bone substitute materials in terms of material degradation and the formation of new bone as a last stage of pre-clinical research, in a bone model most comparable to human. When new bone formation can be demonstrated in this pre-clinical study, further clinical research can be performed to provide an off-the-shelf bone substitute material for clinical practice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
goat	registered breeder	32	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment.

All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo. Multiple defects (i.e. split-mouth design and both femora and both iliac crests) will be created per animal to reduce the total number of laboratory animals needed.

The same goat will be used for implantation in the femora and iliac crests as well as for a sinus elevation procedure.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication and an antibiotic drug will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

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.

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the goats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the animals will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate.

An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the goats will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.

To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the goats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the goats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

Its important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
8. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

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).

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

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.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the iliac crests and femora for histological analysis.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0036
2. Titel van het project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
3. Titel van de NTS: Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - in vergadering besproken: 13-04-2015, 04-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbrekingen van 20-04-2015 tot 23-04-2015, van 11-05-2015 tot 25-06-2015, en van 13-07-2015 tot 27-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 27-07-2015
 - advies aan CCD: 18-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -1.1 Diabetes en osteoporose komen wel voor in de titel, maar worden niet genoemd in de samenvatting. De commissie verzoekt de onderzoekers dit aan te passen.
 - -3.3 De geschatte aantallen komen niet overeen met de aantallen in de Description of animal procedures. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming te brengen.
 - - De onderzoekers worden verzocht de NTS in te korten tot ongeveer 500 woorden, conform de richtlijnen van de CCD.
 - **Project Proposal:**

- - 3.1. De huidige beschrijving van de wetenschappelijke achtergrond voldoet niet aan de richtlijnen daarvoor in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag. De commissie verzoekt u de beschrijving van de achtergrond in overeenstemming te brengen met genoemde toelichting, en meer aandacht te besteden aan de internationale stand van het onderzoek in dit vakgebied, de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose, en de aanleiding tot dit onderzoek. De beschreven hoofddoelstelling volgt nu niet logischerwijs uit de beschreven wetenschappelijke achtergrond.
- -3.4.2 Waarom willen de onderzoekers de botvervangende materialen in konijnen testen? Zij schrijven zelf dat het konijn als modeldier voor de mens niet zo geschikt is, terwijl geiten dat wel zijn. Kan het onderzoek niet beperkt worden tot rat en geit?
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. De onderbouwing voor het gebruik van de voorgestelde modellen en primaire uitkomstparameters ontbreekt, en de proeven zijn niet in voldoende detail beschreven. Het is bijvoorbeeld niet duidelijk op welke tijdstippen de onderzoekers de botvorming zullen bestuderen en waarom zij voor deze tijdstippen kiezen. Verwachten de onderzoekers dat de gekozen primaire uitkomstparameters in proef 3 afwijken in de genoemde ziektemodellen en zo ja waarop is die verwachting gebaseerd? Waarom is long-term follow-up niet belangrijk in de modellen voor diabetes en osteoporose? Waarom willen de onderzoekers zoveel laesies in geiten aanbrengen? Zij worden verzocht dit onderdeel van dierproef 1-6 in overeenstemming te brengen met de beschrijving hiervan in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- - Dierproef 1-6, B. De onderbouwing van de aantallen dieren aan de hand van een globale omschrijving van de onderzoeksgroepen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Indien hiervoor dezelfde dieren worden gebruikt, verzoekt de commissie de onderzoekers dit in één dierproef te beschrijven of duidelijker aan te geven dat het dezelfde dieren betreft (zie ook de vraag over de niet-technische samenvatting punt 3.3).
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- -1.1 Dit is aangepast in de niet technische samenvatting en blauw gemarkeerd.
- -3.3 Dit is aangepast zodanig dat de aantallen in de Description of animal procedures en in de NTS overeenkomen.
- -De NTS is sterk ingekort.
- **Project Proposal:**
- -3.1. De beschrijving van de achtergrond is in overeenstemming gebracht met de toelichting, waarbij aandacht is besteed aan de genoemde aspecten. De toegevoegde beschrijving is blauw gemarkeerd.
- -3.4.2 Konijnen zijn geschikt om defecten te creëren van een zodanige grootte, dat het botvervangende materiaal geïnjecteerd kan worden in het botdefect. Dit is niet mogelijk in de botten van ratten. Het konijn is het kleinste dier geschikt voor onderzoek naar injecteerbare botvervangende materialen. Het konijn is eveneens zeer geschikt voor onderzoek naar de lange termijn prestaties van het botvervangende materiaal (tot 26 weken, waarbij volledige

degradatie overeenkomt met deze implantatietijd) op het gebied van degradatie van het materiaal en op het gebied van ondersteuning van de ontwikkeling van nieuw bot ter plaatse. Wanneer kan worden aangetoond dat het materiaal op de lange termijn goed presteert, kan het materiaal getest worden in geiten, waarbij een betere vergelijking gemaakt kan worden met het gedrag in menselijk bot, vanwege de overeenkomsten in mechanische belasting en de overeenkomsten in botontwikkelingen en botgenezing. Vanwege het botmetabolisme van de geit, vele gelijkenissen vertonend met dat van de mens, is de geit minder geschikt dan het konijn om de prestaties van het materiaal op lange termijn te testen. Het botmetabolisme van het konijn is namelijk veel sneller dan dat van de geit, waardoor volledige vervanging van het botvervangende materiaal door bot al bij 26 weken kan worden gezien, in tegenstelling tot bij geiten.

- *Bovenstaande is opgenomen in de project proposal punt 3.4.2 en blauw gemarkeerd.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A *De opmerkingen zijn verwerkt en blauw gemarkeerd.*
- - Dierproef 1-6, B. *De omschrijving van de experimentele groepen is toegevoegd en blauw gemarkeerd.*
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. *Voor de dierproeven met betrekking tot ectopische en orthotopische implantatie in ratten worden dezelfde dieren gebruikt. Deze dierproeven zijn nu samengevoegd tot één dierproef. Voor de dierproeven met betrekking tot orthotopische implantatie en sinusbodemelevatie procedures worden eveneens dezelfde dieren (geiten) gebruikt. Deze dierproeven zijn eveneens samengevoegd tot één dierproef.*
-
- Datum: 11-05-2015
- Strekking van de vragen:
- **Niet-technische samenvatting:**
- 3.3 De aantallen in de niet-technische samenvatting komen nog steeds niet overeen met de aantallen zoals genoemd in de tabellen in de beschrijving van de dierproeven (een totaal van 400 ratten). De onderzoekers worden nogmaals verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.
- **Project Proposal:**
- 3.1 De onderzoekers hebben nog niet aannemelijk gemaakt dat de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose onvoldoende is. Ook ontbreekt een gedegen overzicht, met referenties, van de huidige stand van zaken in het internationale onderzoek naar botvervangende materialen en een onderbouwing waarom een combinatie van bestaande materialen met juist de andere genoemden kansrijk zou zijn. De onderzoekers worden nogmaals verzocht dit aan te passen conform de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. Het is nog steeds niet duidelijk op welke tijdstippen de botvorming bestudeerd zal worden en waarom de onderzoekers voor deze tijdstippen kiezen. Ook hebben zij niet uitgelegd waarom zij de long-term follow-up niet bestuderen in de modellen voor diabetes en osteoporose. De aantallen dieren zijn nog steeds niet voldoende onderbouwd aan de hand van een experimenteel design. Ook is nog steeds niet toegelicht

waarom de onderzoekers zoveel laesies in geiten willen aanbrengen. Zij worden nogmaals verzocht deze informatie toe te voegen.

- -Dierproef 1-6, B. De aantallen dieren in de tabel komen niet overeen met de aantallen dieren in de tekst.
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- *3.3 Reactie: de aantallen zijn aangepast zodat deze door de gehele projectaanvraag eensluidend zijn. Het gaat hierbij om in totaal 225 ratten, waarvan 75 ratten voor onderzoek naar de invloed van diabetes/osteoporose op botgenezing bij gebruik van botvervangend materiaal en 150 ratten voor onderzoek naar de prestaties van nieuw ontwikkeld, experimenteel botvervangend materiaal in gezonde condities. Voorts omvat de projectaanvraag 100 konijnen en 32 geiten voor evaluatie van botregeneratie in alternatieve diermodellen.*
- **Project Proposal:**
- *3.1 Reactie: de achtergrond informatie (3.1) is aangepast en de aanpassingen zijn blauw gemarkeerd, waarbij middels referenties het feit dat botgenezing in patiënten met diabetes of osteoporose afwijkend is, wordt onderbouwd. Tevens is de huidige stand van zaken in (internationaal) onderzoek naar botvervangende materialen toegevoegd, waaruit blijkt dat door de combinatie van geïjkt biomateriaal voor botvervangende materialen (i.e. calciumfosfaat) met snel degraderende componenten (zgn. porogens o.b.v. bijvoorbeeld polymeren) doeltreffend is voor de optimalisatie van botregeneratie.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. *Reactie: de tijdstippen waarop de botvorming bestudeerd zal worden, zijn voor elk specifiek projectonderdeel toegevoegd in de beschrijving van de dierproeven alsook waarom voor deze tijdstippen gekozen is. Voorts zijn de aantallen dieren onderbouwd en is toegelicht wat het doel van de experimenten met geiten is.*
- -Dierproef 1-6, B. *Reactie: de aantallen dieren in de tabel en tekst zijn aangepast zodat zij overeenkomen.*
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel A tweede vraag: In de laatste zin is sprake van ratten terwijl konijnen bedoeld worden. De onderzoekers worden verzocht dit te corrigeren.
- -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: De onderzoekers willen alle 12 materialen die getest worden in ratten, daarna ook testen in konijnen. Is het niet de bedoeling dat in de sequentie rat>konijn>geit steeds een selectie van de beste materialen plaatsvindt? Dit wordt wel gesuggereerd onder 3.4.3 van het Project proposal. De onderzoekers worden verzocht een selectie te maken en aan te geven op grond waarvan zij materialen selecteren voor deze dierproef, of aannemelijk te maken dat alle botvervangende materialen in konijnen getest dienen te worden.
- Datum antwoord: 27-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

- **Description of Animal Procedures:**
 - -DAP3, onderdeel A tweede vraag: *Reactie: bovenstaande is gecorrigeerd.*
 - -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: *Reactie: een selectie van de beste materialen is toegevoegd en tevens is aangegeven op grond waarvan de materialen geselecteerd worden voor de dierproeven. De tekst waarin dit beschreven wordt is vetgedrukt.*
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
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 'to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions)'. Grote botdefecten genezen vaak niet spontaan. Het defect dient dan te worden "opgevuld" om te zorgen dat het bot weer herstelt of aan elkaar groeit. Het verkrijgen van goede synthetische botvervangende materialen die voor dit doel kunnen worden gebruikt is van belang, omdat zij het gebruik van allogeen bot of autoloog bot voor de behandeling van botdefecten kunnen voorkomen. Zowel het gebruik van donorbot, als het gebruik van eigen bot van de patiënt heeft belangrijke nadelen. Voor het gebruik van botmateriaal van de patiënt zelf is bijvoorbeeld een belastende operatie nodig (in feite wordt dan elders in het lichaam een botdefect gecreëerd). Voor synthetische botvervangende materialen is het van belang dat ze biocompatibel zijn, met de juiste snelheid worden afgebroken en tegelijk de vorming van nieuw eigen bot stimuleren. Dit project zal duidelijk maken of het nieuw ontwikkelde botvervangende materiaal een verbetering ten opzichte van het huidige synthetische botvervangende materiaal op basis van CaP laat zien voor wat betreft gecontroleerde degradatie en stimulatie van botvorming bij ratten, konijnen en geiten. De experimenten zullen een indicatie geven of dit nieuwe materiaal ook een verbetering zal betekenen op deze gebieden wanneer het wordt gebruikt bij patiënten met osteoporose of diabetes bij wie het botvormingsproces minder goed verloopt als gevolg van hun ziekte.

Bovendien wordt een indruk verkregen van de lange termijn effecten van toepassing van dit materiaal. Een dergelijk synthetisch botvervangend materiaal zou gebruikt kunnen worden bij patiënten met botdefecten in tanden, kaken, ruggenwervels en het bewegingsapparaat. Het beschikbaar komen van verbeterde materialen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De proeven in de verschillende diersoorten volgen logisch op elkaar en geven antwoorden op verschillende typen vragen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken welke factoren van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP belangrijk zijn voor de gewenste biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming, en welk effect de toevoeging van antibiotica en bioorganische stoffen op deze parameters heeft. Het onderzoek geeft een indicatie van de mogelijkheid om dit materiaal toe te passen bij de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose.
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 ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. Bij een aantal dieren zal bovendien osteoporose of diabetes worden geïnduceerd, waarna ze adequate behandeling hiervan zullen ontvangen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en orchidectomie in als matig, en de behandeling van osteoporose en de inductie en behandeling van diabetes als licht. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden een aantal botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Op grond van de resultaten bij ratten worden een aantal materialen getest in konijnen. Alvorens experimenten met geiten plaatsvinden zal weer een selectie gemaakt worden van te testen materialen op grond van de resultaten bij konijnen. De volgorde van de experimenten en de noodzaak om in alle drie de diersoorten experimenten te verrichten, is goed beargumenteerd. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 ratten, 75 konijnen en 32 geiten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie, en adequate behandeling van diabetes en osteoporose. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag hoe de samenstelling en structuur van synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP, en de toevoeging van antibiotica en bioinorganische stoffen daaraan, eigenschappen als biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming beïnvloeden. De resultaten geven onder andere een indicatie of deze materialen ook met succes kunnen worden toegepast voor de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, gezien de toename van het aantal ouderen in onze maatschappij en de nadelen van het nu beschikbare materiaal voor met name patiënten met osteoporose en diabetes.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en in sommige gevallen het induceren en behandelen van diabetes of osteoporose. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
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
AVD103002015227

Bijlagen

2

Datum 27-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015227. 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. 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
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein-Noord 9
Postbus: 91025
Postcode en plaats: 6525 EZ NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
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: 25 september 2015
Geplande einddatum: 25 september 2020
Titel project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
Titel niet-technische samenvatting: Botvangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
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: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
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
AVD103002015227

Bijlagen

2

Datum 27-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 27 augustus 2015

Vervaldatum: 26 september 2015

Factuurnummer: 201570227

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015227	€ 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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 6 oktober 2015 17:12
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Beste [REDACTED]

Hierbij de antwoorden van de onderzoekster m.b.t. dit project.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Geachte mevrouw [REDACTED]

Hierbij doe ik u de antwoorden op de vragen toekomen m.b.t. projectvoorstel AVD103002015227 getiteld: "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes":

1. In de experimentele opzet beschrijft u dat de te testen bone substitutes simultaan in gezonde ratten en in ratten met een ziektemodel getest worden (bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2). Uit uw beschrijving maken wij op dat alleen die bot vervangende middelen getest worden in konijnen en geiten wanneer die in beide rattenmodellen veelbelovende resultaten geven. Kunt u bevestigen of dit de juiste interpretatie is?

Antwoord vraag 1: deze interpretatie is grotendeels juist. Wanneer de te testen botvervangende materialen in gezonde ratten veelbelovende resultaten geven, zullen deze botvervangende materialen verder getest worden in gezonde konijnen en geiten. Alleen die botvervangende materialen die een goed resultaat geven in gezonde ratten zullen verder worden getest in gezonde konijnen en geiten.

In de ratten met een ziektemodel wordt de invloed van de ziekte getest op de biologische prestatie van botvervangend materiaal. Het botvervangend materiaal wordt niet getest in konijnen of geiten met een ziektemodel. Met andere woorden: voor het ziektemodel worden slechts ratten gebruikt.

2. In de bijlages beschrijving dierproeven geeft u alleen in bijlage 3.4.4.3 aan dat u vrouwelijke konijnen wilt inzetten. Kunt u voor de ratten en geiten uit de andere bijlages ook aangeven welk geslacht dieren u wilt inzetten en als u de voorkeur heeft voor 1 geslacht kunt u dit dan toelichten?

Antwoord vraag 2: alle ratten die worden ingezet zijn mannelijk. Mannelijke ratten hebben het voordeel substantieel grotere femur te hebben dan vrouwelijke ratten wat noodzakelijk is voor het creëren van de gewenste botdefecten in de femora (Alghamdi H.S., Tissue Engineering Part C Methods, 2013)

Alle geiten die worden ingezet zijn vrouwelijk. Geiten komen van een gangbare boerderij waar zij worden ingezet voor melkproductie. Wanneer zij niet toereikend zijn voor melkproductie (te lage melkproductie) worden zij ingezet in dierexperimenteel onderzoek. Grote hoeveelheden bokken worden niet gehouden op een boerderij, aangezien zij geen melk produceren.

Hartelijk dank voor het in behandeling nemen van ons projectvoorstel,

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 16:20
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog geen antwoord ontvangen op onderstaande vragen. Het kan zijn dat u deze mail niet heeft ontvangen omdat wij op dit moment wat technische problemen met de mail. Wij zien uw antwoord graag tegemoet,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Van: Info-zbo

Verzonden: donderdag 1 oktober 2015 13:40

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Geachte [REDACTED]

Bij de behandeling van uw projectvoorstel AVD103002015227 getiteld: "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" hebben wij nog de volgende vragen:

In de experimentele opzet beschrijft u dat de te testen bone substitutes simultaan in gezonde ratten en in ratten met een ziektemodel getest worden (bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2). Uit uw beschrijving maken wij op dat alleen die bot vervangende middelen getest worden in konijnen en geiten wanneer die in beide rattenmodellen veelbelovende resultaten geven. Kunt u bevestigen of dit de juiste interpretatie is?

In de bijlages beschrijving dierproeven geeft u alleen in bijlage 3.4.4.3 aan dat u vrouwelijke konijnen wilt inzetten. Kunt u voor de ratten en geiten uit de andere bijlages ook aangeven welk geslacht dieren u wilt inzetten en als u de voorkeur heeft voor 1 geslacht kunt u dit dan toelichten?

U kunt deze vragen per mail beantwoorden,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

Uw referentie

Bijlagen
1

14 OKT. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015227. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD of u de keuze voor mannelijk of vrouwelijke dieren nader kon motiveren.

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. De tweede voorwaarde is een algemene voorwaarde die wordt gesteld bij projecten met een 5-jarige looptijd, om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 oktober 2015 tot en met 25 september 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

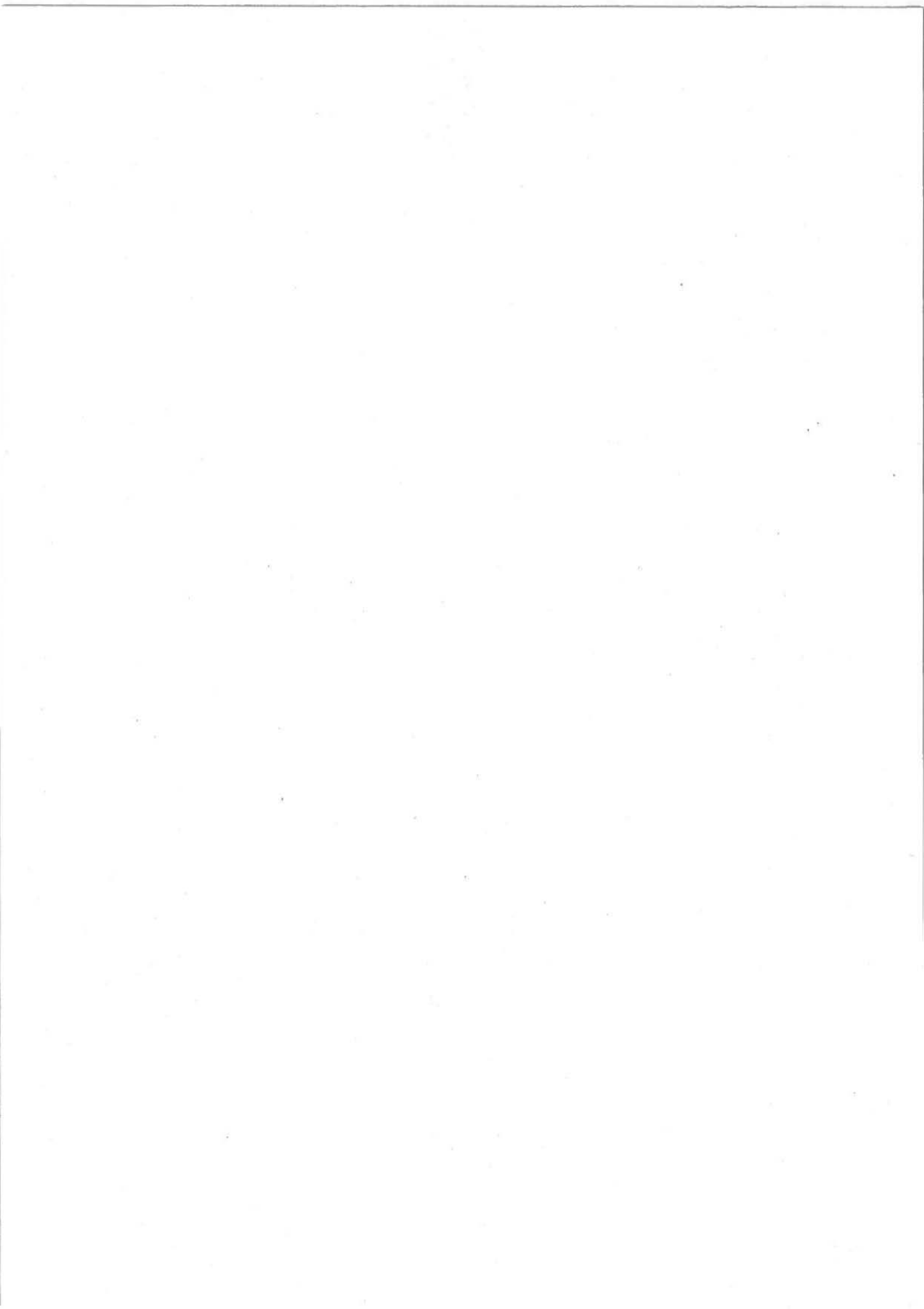
Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 augustus 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. De CCD stelt aanvullend een paar algemene voorwaarden.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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



Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

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

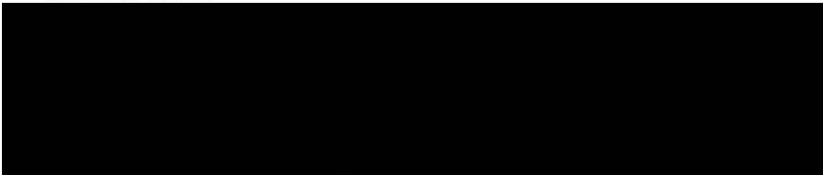
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



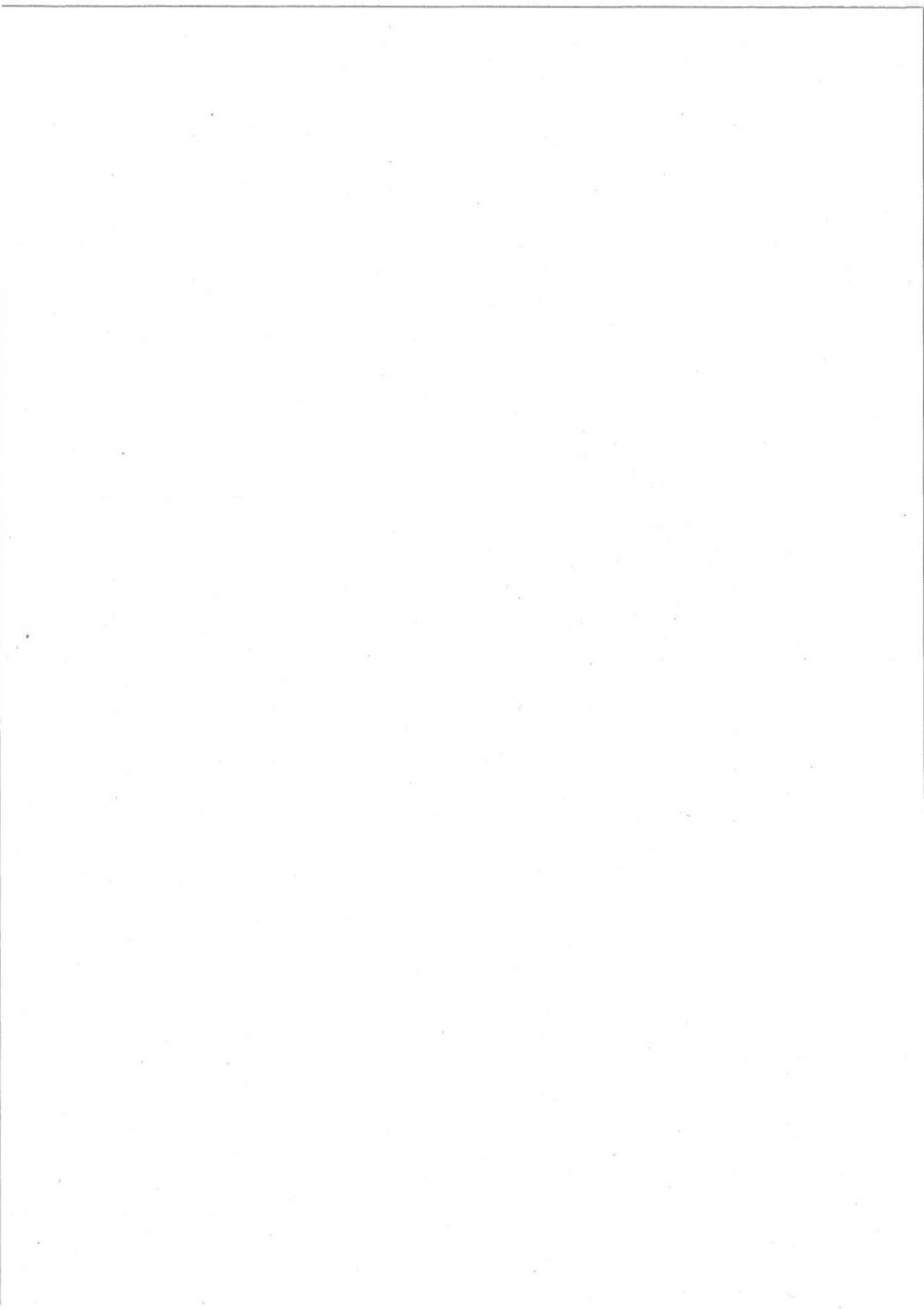
Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: postbus 91025
Postcode en woonplaats: 6525 EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 oktober 2015 tot en met 25 september 2020, voor het project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015227, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker in opleiding. Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op dd 18 augustus 2015, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 oktober 2015.

Dierproeven

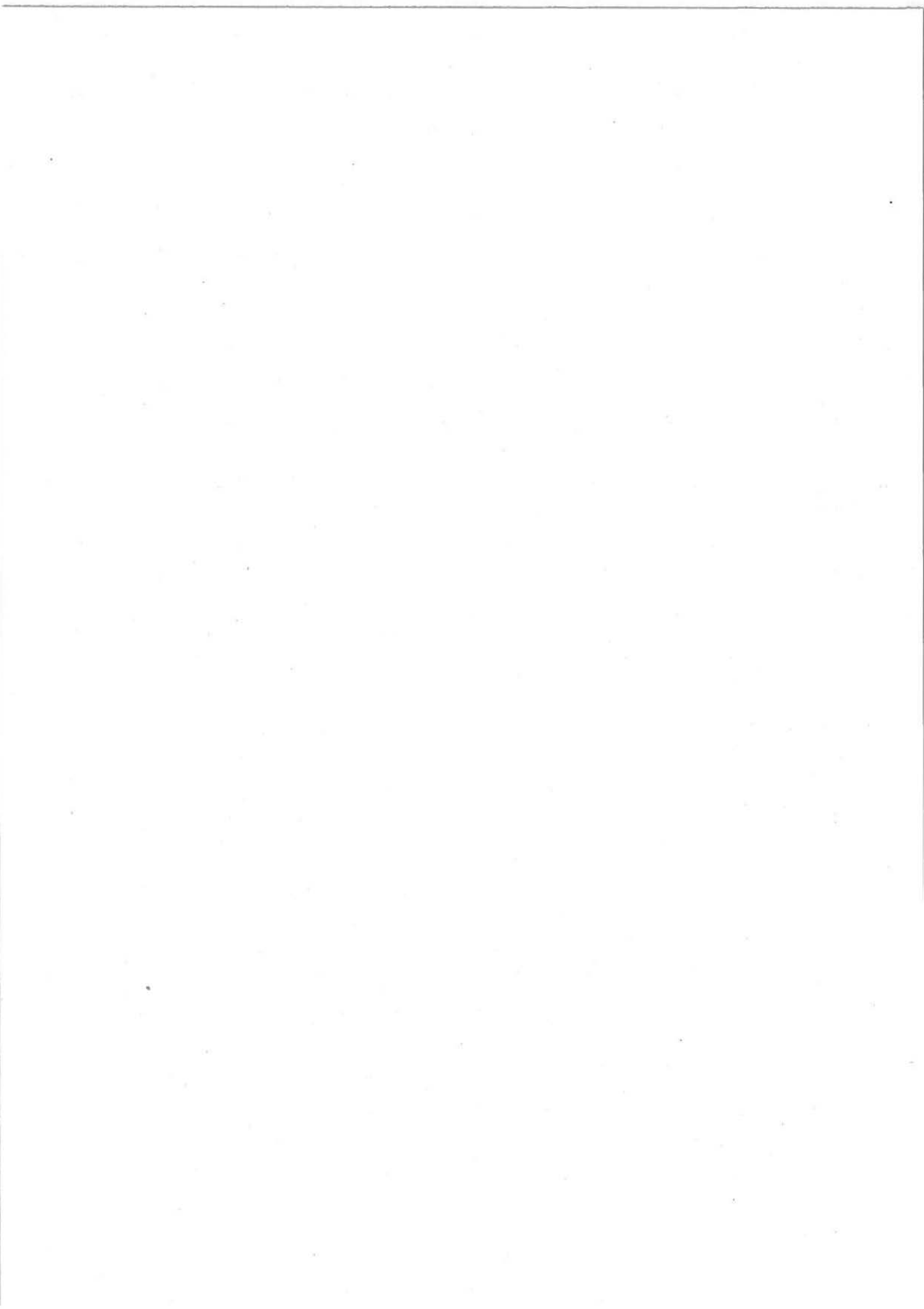
Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Bone substitutes in healthy rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	150	Matig / moderate
Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	75	Matig / moderate
Bone substitutes in healthy rabbits	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand White	75	Matig / moderate
Bone substitutes in healthy goats	Geiten (<i>Capra aegagrus hircus</i>) / niet benoemd	32	Matig / moderate

Voorwaarden

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

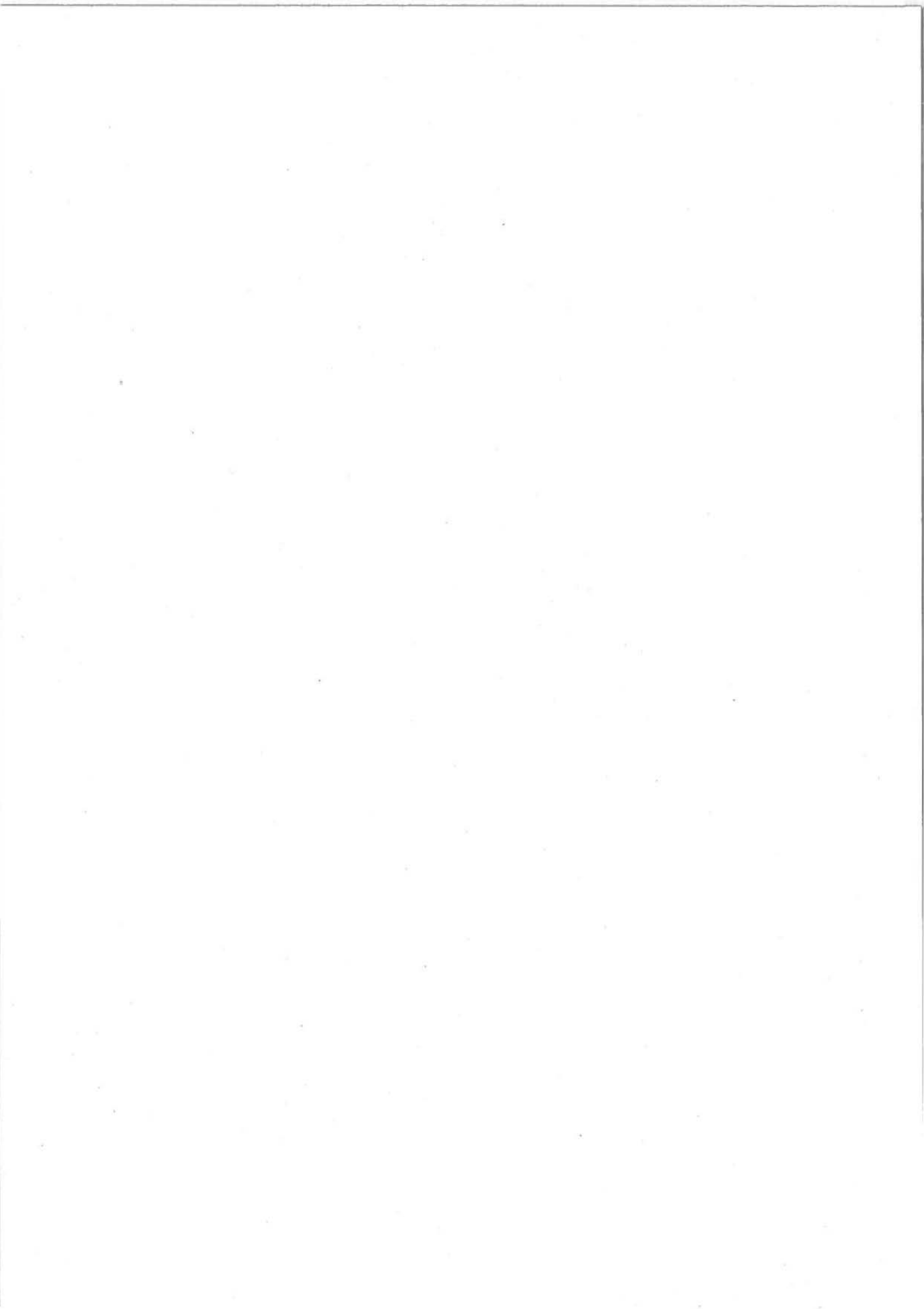
De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat beslissingen over go/no go momenten worden genomen met instemming van de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te



Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

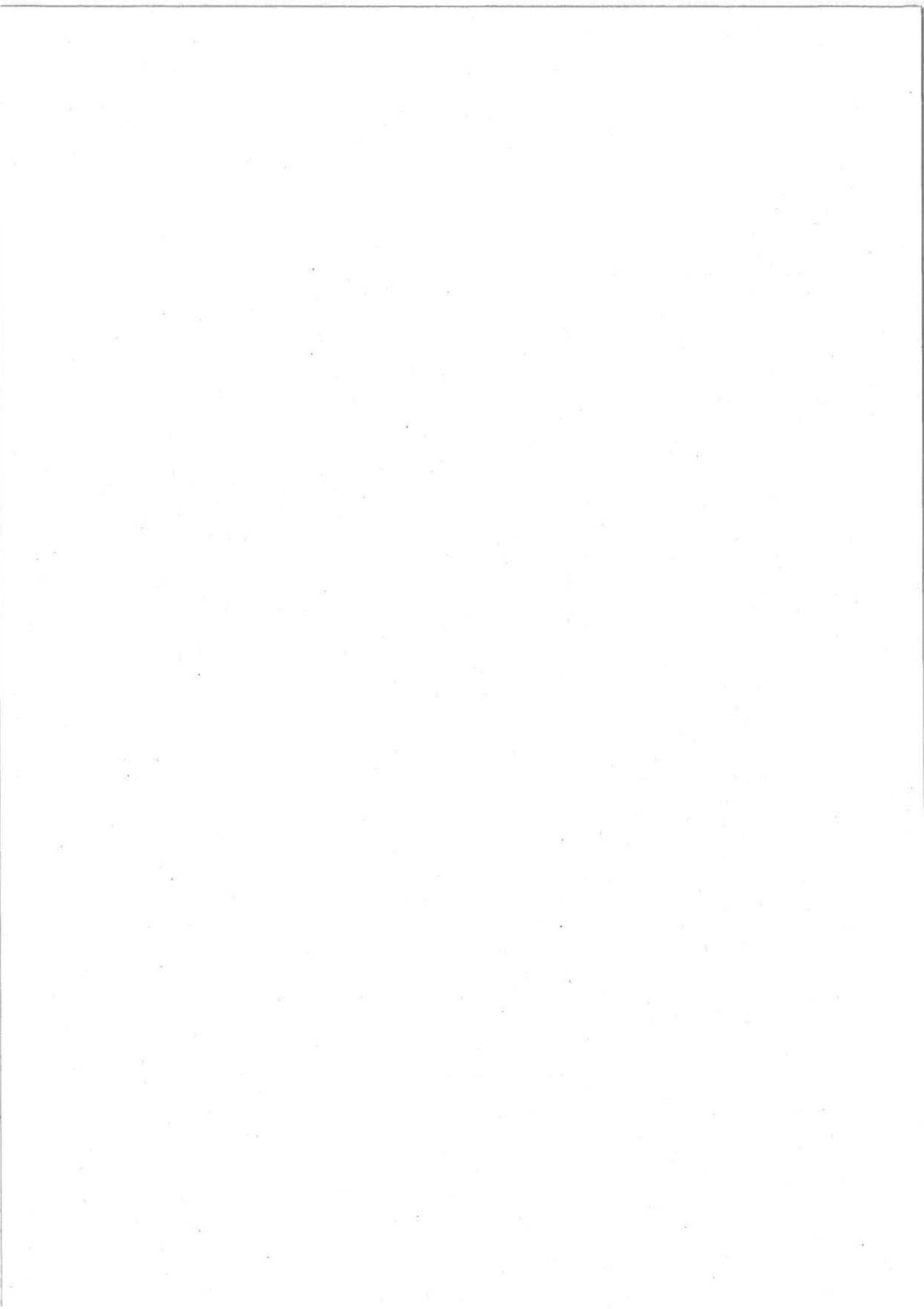
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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



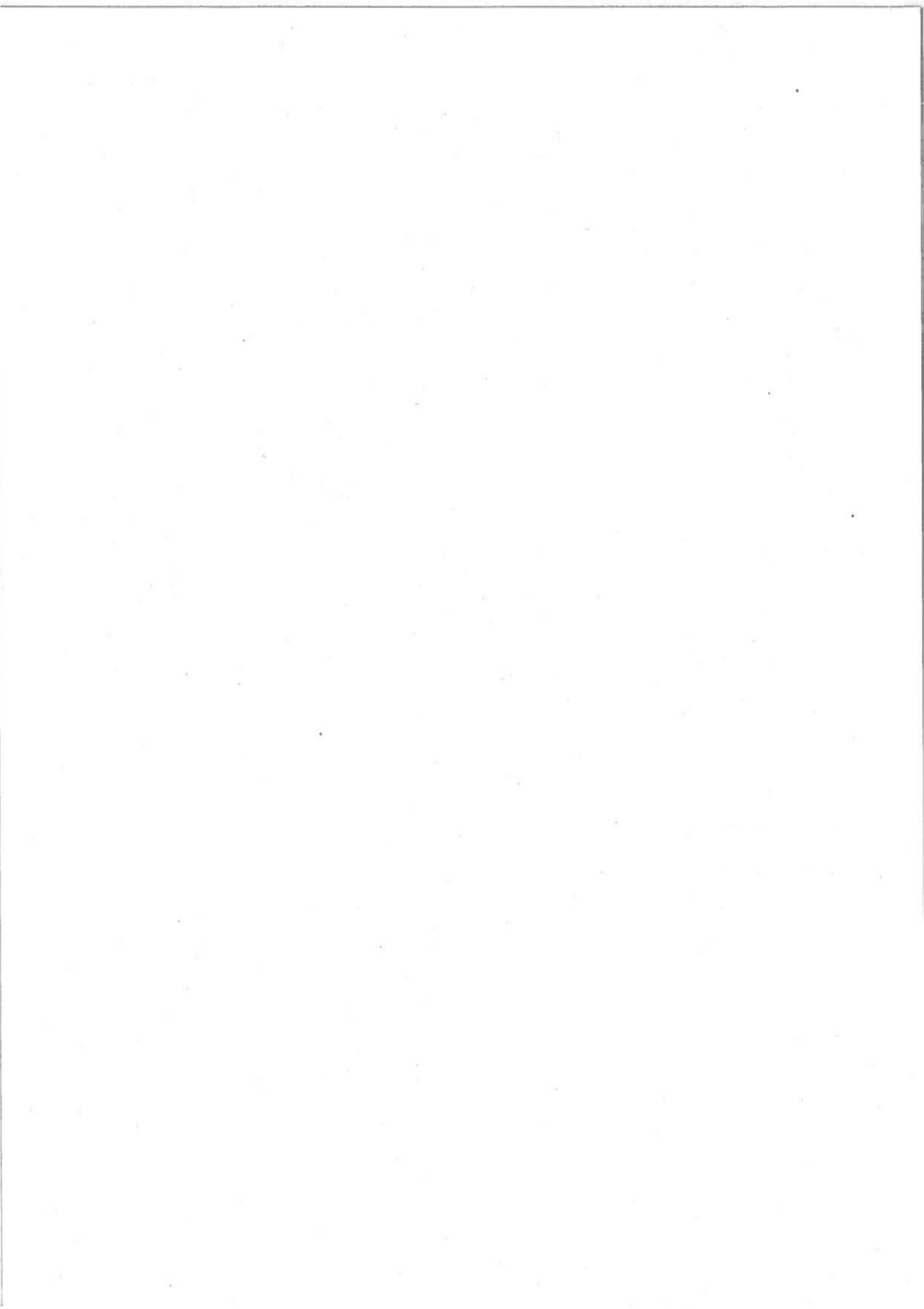
Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

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

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

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

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



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0036
2. Titel van het project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
3. Titel van de NTS: Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - in vergadering besproken: 13-04-2015, 04-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbrekingen van 20-04-2015 tot 23-04-2015, van 11-05-2015 tot 25-06-2015, en van 13-07-2015 tot 27-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 27-07-2015
 - advies aan CCD: 18-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -1.1 Diabetes en osteoporose komen wel voor in de titel, maar worden niet genoemd in de samenvatting. De commissie verzoekt de onderzoekers dit aan te passen.
 - -3.3 De geschatte aantallen komen niet overeen met de aantallen in de Description of animal procedures. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming te brengen.
 - - De onderzoekers worden verzocht de NTS in te korten tot ongeveer 500 woorden, conform de richtlijnen van de CCD.
 - **Project Proposal:**

- - 3.1. De huidige beschrijving van de wetenschappelijke achtergrond voldoet niet aan de richtlijnen daarvoor in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag. De commissie verzoekt u de beschrijving van de achtergrond in overeenstemming te brengen met genoemde toelichting, en meer aandacht te besteden aan de internationale stand van het onderzoek in dit vakgebied, de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose, en de aanleiding tot dit onderzoek. De beschreven hoofddoelstelling volgt nu niet logischerwijs uit de beschreven wetenschappelijke achtergrond.
- -3.4.2 Waarom willen de onderzoekers de botvervangende materialen in konijnen testen? Zij schrijven zelf dat het konijn als modeldier voor de mens niet zo geschikt is, terwijl geiten dat wel zijn. Kan het onderzoek niet beperkt worden tot rat en geit?
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. De onderbouwing voor het gebruik van de voorgestelde modellen en primaire uitkomstparameters ontbreekt, en de proeven zijn niet in voldoende detail beschreven. Het is bijvoorbeeld niet duidelijk op welke tijdstippen de onderzoekers de botvorming zullen bestuderen en waarom zij voor deze tijdstippen kiezen. Verwachten de onderzoekers dat de gekozen primaire uitkomstparameters in proef 3 afwijken in de genoemde ziektemodellen en zo ja waarop is die verwachting gebaseerd? Waarom is long-term follow-up niet belangrijk in de modellen voor diabetes en osteoporose? Waarom willen de onderzoekers zoveel laesies in geiten aanbrenge? Zij worden verzocht dit onderdeel van dierproef 1-6 in overeenstemming te brengen met de beschrijving hiervan in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- - Dierproef 1-6, B. De onderbouwing van de aantallen dieren aan de hand van een globale omschrijving van de onderzoeksgroepen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Indien hiervoor dezelfde dieren worden gebruikt, verzoekt de commissie de onderzoekers dit in één dierproef te beschrijven of duidelijker aan te geven dat het dezelfde dieren betreft (zie ook de vraag over de niet-technische samenvatting punt 3.3).
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- -1.1 Dit is aangepast in de niet technische samenvatting en blauw gemarkeerd.
- -3.3 Dit is aangepast zodanig dat de aantallen in de Description of animal procedures en in de NTS overeenkomen.
- -De NTS is sterk ingekort.
- **Project Proposal:**
- -3.1. De beschrijving van de achtergrond is in overeenstemming gebracht met de toelichting, waarbij aandacht is besteed aan de genoemde aspecten. De toegevoegde beschrijving is blauw gemarkeerd.
- -3.4.2 Konijnen zijn geschikt om defecten te creëren van een zodanige grootte, dat het botvervangende materiaal geïnjecteerd kan worden in het botdefect. Dit is niet mogelijk in de botten van ratten. Het konijn is het kleinste dier geschikt voor onderzoek naar injecteerbare botvervangende materialen. Het konijn is eveneens zeer geschikt voor onderzoek naar de lange termijn prestaties van het botvervangende materiaal (tot 26 weken, waarbij volledige

degradatie overeenkomt met deze implantatietijd) op het gebied van degradatie van het materiaal en op het gebied van ondersteuning van de ontwikkeling van nieuw bot ter plaatse. Wanneer kan worden aangetoond dat het materiaal op de lange termijn goed presteert, kan het materiaal getest worden in geiten, waarbij een betere vergelijking gemaakt kan worden met het gedrag in menselijk bot, vanwege de overeenkomsten in mechanische belasting en de overeenkomsten in botontwikkelingen en botgenezing. Vanwege het botmetabolisme van de geit, vele gelijkenissen vertonend met dat van de mens, is de geit minder geschikt dan het konijn om de prestaties van het materiaal op lange termijn te testen. Het botmetabolisme van het konijn is namelijk veel sneller dan dat van de geit, waardoor volledige vervanging van het botvervangende materiaal door bot al bij 26 weken kan worden gezien, in tegenstelling tot bij geiten.

- *Bovenstaande is opgenomen in de project proposal punt 3.4.2 en blauw gemarkeerd.*
- **Description of Animal Procedures:**
- *- Dierproef 1-6, A De opmerkingen zijn verwerkt en blauw gemarkeerd.*
- *- Dierproef 1-6, B. De omschrijving van de experimentele groepen is toegevoegd en blauw gemarkeerd.*
- *-Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Voor de dierproeven met betrekking tot ectopische en orthotopische implantatie in ratten worden dezelfde dieren gebruikt. Deze dierproeven zijn nu samengevoegd tot één dierproef. Voor de dierproeven met betrekking tot orthotopische implantatie en sinusbodemelevatie procedures worden eveneens dezelfde dieren (geiten) gebruikt. Deze dierproeven zijn eveneens samengevoegd tot één dierproef.*
-
- Datum: 11-05-2015
- Strekking van de vragen:
- **Niet-technische samenvatting:**
- 3.3 De aantallen in de niet-technische samenvatting komen nog steeds niet overeen met de aantallen zoals genoemd in de tabellen in de beschrijving van de dierproeven (een totaal van 400 ratten). De onderzoekers worden nogmaals verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.
- **Project Proposal:**
- 3.1 De onderzoekers hebben nog niet aannemelijk gemaakt dat de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose onvoldoende is. Ook ontbreekt een gedegen overzicht, met referenties, van de huidige stand van zaken in het internationale onderzoek naar botvervangende materialen en een onderbouwing waarom een combinatie van bestaande materialen met juist de andere genoemde kansrijk zou zijn. De onderzoekers worden nogmaals verzocht dit aan te passen conform de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- **Description of Animal Procedures:**
- *- Dierproef 1-6, A. Het is nog steeds niet duidelijk op welke tijdstippen de botvorming bestudeerd zal worden en waarom de onderzoekers voor deze tijdstippen kiezen. Ook hebben zij niet uitgelegd waarom zij de long-term follow-up niet bestuderen in de modellen voor diabetes en osteoporose. De aantallen dieren zijn nog steeds niet voldoende onderbouwd aan de hand van een experimenteel design. Ook is nog steeds niet toegelicht*

waarom de onderzoekers zoveel laesies in geiten willen aanbrengen. Zij worden nogmaals verzocht deze informatie toe te voegen.

- -Dierproef 1-6, B. De aantallen dieren in de tabel komen niet overeen met de aantallen dieren in de tekst.
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- *3.3 Reactie: de aantallen zijn aangepast zodat deze door de gehele projectaanvraag eensluidend zijn. Het gaat hierbij om in totaal 225 ratten, waarvan 75 ratten voor onderzoek naar de invloed van diabetes/osteoporose op botgenezing bij gebruik van botvervangend materiaal en 150 ratten voor onderzoek naar de prestaties van nieuw ontwikkeld, experimenteel botvervangend materiaal in gezonde condities. Voorts omvat de projectaanvraag 100 konijnen en 32 geiten voor evaluatie van botregeneratie in alternatieve diermodellen.*
- **Project Proposal:**
- *3.1 Reactie: de achtergrond informatie (3.1) is aangepast en de aanpassingen zijn blauw gemarkeerd, waarbij middels referenties het feit dat botgenezing in patiënten met diabetes of osteoporose afwijkend is, wordt onderbouwd. Tevens is de huidige stand van zaken in (internationaal) onderzoek naar botvervangende materialen toegevoegd, waaruit blijkt dat door de combinatie van geijkt biomateriaal voor botvervangende materialen (i.e. calciumfosfaat) met snel degraderende componenten (zgn. porogens o.b.v. bijvoorbeeld polymeren) doeltreffend is voor de optimalisatie van botregeneratie.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. *Reactie: de tijdstippen waarop de botvorming bestudeerd zal worden, zijn voor elk specifiek projectonderdeel toegevoegd in de beschrijving van de dierproeven alsook waarom voor deze tijdstippen gekozen is. Voorts zijn de aantallen dieren onderbouwd en is toegelicht wat het doel van de experimenten met geiten is.*
- -Dierproef 1-6, B. *Reactie: de aantallen dieren in de tabel en tekst zijn aangepast zodat zij overeenkomen.*
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel A tweede vraag: In de laatste zin is sprake van ratten terwijl konijnen bedoeld worden. De onderzoekers worden verzocht dit te corrigeren.
- -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: De onderzoekers willen alle 12 materialen die getest worden in ratten, daarna ook testen in konijnen. Is het niet de bedoeling dat in de sequentie rat>konijn>geit steeds een selectie van de beste materialen plaatsvindt? Dit wordt wel gesuggereerd onder 3.4.3 van het Project proposal. De onderzoekers worden verzocht een selectie te maken en aan te geven op grond waarvan zij materialen selecteren voor deze dierproef, of aannemelijk te maken dat alle botvervangende materialen in konijnen getest dienen te worden.
- Datum antwoord: 27-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

- **Description of Animal Procedures:**
 - -DAP3, onderdeel A tweede vraag: *Reactie: bovenstaande is gecorrigeerd.*
 - -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: *Reactie: een selectie van de beste materialen is toegevoegd en tevens is aangegeven op grond waarvan de materialen geselecteerd worden voor de dierproeven. De tekst waarin dit beschreven wordt is vetgedrukt.*
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
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 'to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions)'. Grote botdefecten genezen vaak niet spontaan. Het defect dient dan te worden "opgevuld" om te zorgen dat het bot weer herstelt of aan elkaar groeit. Het verkrijgen van goede synthetische botvervangende materialen die voor dit doel kunnen worden gebruikt is van belang, omdat zij het gebruik van allogeen bot of autoloog bot voor de behandeling van botdefecten kunnen voorkomen. Zowel het gebruik van donorbot, als het gebruik van eigen bot van de patiënt heeft belangrijke nadelen. Voor het gebruik van botmateriaal van de patiënt zelf is bijvoorbeeld een belastende operatie nodig (in feite wordt dan elders in het lichaam een botdefect gecreëerd). Voor synthetische botvervangende materialen is het van belang dat ze biocompatibel zijn, met de juiste snelheid worden afgebroken en tegelijk de vorming van nieuw eigen bot stimuleren. Dit project zal duidelijk maken of het nieuw ontwikkelde botvervangende materiaal een verbetering ten opzichte van het huidige synthetische botvervangende materiaal op basis van CaP laat zien voor wat betreft gecontroleerde degradatie en stimulatie van botvorming bij ratten, konijnen en geiten. De experimenten zullen een indicatie geven of dit nieuwe materiaal ook een verbetering zal betekenen op deze gebieden wanneer het wordt gebruikt bij patiënten met osteoporose of diabetes bij wie het botvormingsproces minder goed verloopt als gevolg van hun ziekte.

Bovendien wordt een indruk verkregen van de lange termijn effecten van toepassing van dit materiaal. Een dergelijk synthetisch botvervangend materiaal zou gebruikt kunnen worden bij patiënten met botdefecten in tanden, kaken, ruggenwervels en het bewegingsapparaat. Het beschikbaar komen van verbeterde materialen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De proeven in de verschillende diersoorten volgen logisch op elkaar en geven antwoorden op verschillende typen vragen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken welke factoren van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP belangrijk zijn voor de gewenste biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming, en welk effect de toevoeging van antibiotica en bioorganische stoffen op deze parameters heeft. Het onderzoek geeft een indicatie van de mogelijkheid om dit materiaal toe te passen bij de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose.
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 ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. Bij een aantal dieren zal bovendien osteoporose of diabetes worden geïnduceerd, waarna ze adequate behandeling hiervan zullen ontvangen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en orchidectomie in als matig, en de behandeling van osteoporose en de inductie en behandeling van diabetes als licht. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden een aantal botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Op grond van de resultaten bij ratten worden een aantal materialen getest in konijnen. Alvorens experimenten met geiten plaatsvinden zal weer een selectie gemaakt worden van te testen materialen op grond van de resultaten bij konijnen. De volgorde van de experimenten en de noodzaak om in alle drie de diersoorten experimenten te verrichten, is goed beargumenteerd. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 ratten, 75 konijnen en 32 geiten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie, en adequate behandeling van diabetes en osteoporose. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

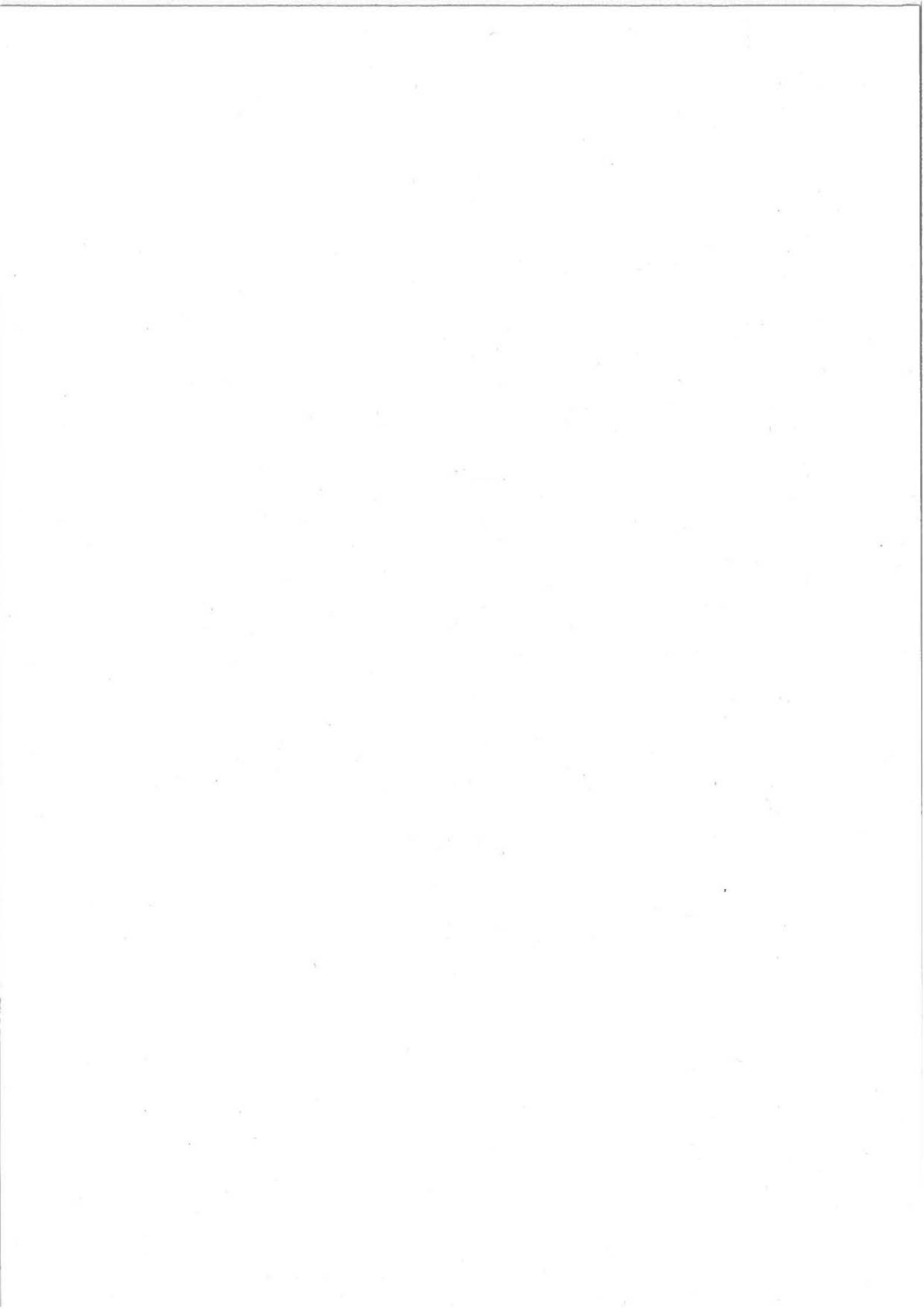
Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag hoe de samenstelling en structuur van synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP, en de toevoeging van antibiotica en bioinorganische stoffen daaraan, eigenschappen als biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming beïnvloeden. De resultaten geven onder andere een indicatie of deze materialen ook met succes kunnen worden toegepast voor de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, gezien de toename van het aantal ouderen in onze maatschappij en de nadelen van het nu beschikbare materiaal voor met name patiënten met osteoporose en diabetes.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en in sommige gevallen het induceren en behandelen van diabetes of osteoporose. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

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



[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 14:32
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD103002015227
Bijlagen: Beschikking 227.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

[Redacted]

.....
[Redacted] Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....