

	Inventaris Wob-verzoek W16-10S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015285								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x			x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	
14	Mail terugkoppeling DEC 17-12-2015				x		x	x	



22 OKT. 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 1285 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 7 5 9 2 4</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td colspan="2">Instntie voor Dierenwelzijn Utrecht</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA</td><td>Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Instntie voor Dierenwelzijn Utrecht		Postbus	12007		Postcode en plaats	3501AA	Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht	
Straat en huisnummer	Instntie voor Dierenwelzijn Utrecht																
Postbus	12007																
Postcode en plaats	3501AA	Utrecht															
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | ☐ 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 | 0 1 _ 0 9 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 3 0 _ 0 8 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Regeneratieve behandelingen voor chronische rugpijn
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- ☐ Wijziging € 468,00 Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☐ Melding Machtiging
- ☒ Project Proposal [redacted] UU_2015_Appendix

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.
- Naam [redacted]
- Functie [redacted]
- Plaats [redacted]
- Datum 10-10-2015
- Handtekening [redacted]



Form

Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- ☒ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☐ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The project focuses on developing treatment strategies for neck and back pain of canine and human patients in close collaboration with academia from the medical and bioengineering field.

Low back pain in humans has been identified as one out of seven high-burden conditions by the 2013 Report *Priority Medicines for Europe and the World*. (Kaplan *et al.*, 2013) It is the most common type of pain restricting daily activity in EU citizens" (Eurobarometer, 2007) and entails the largest number of years lived with disability. (Hoy *et al.*, 2014) Neck and back pain are strongly related to intervertebral disc (IVD) degeneration (Cheung *et al.*, 2009). Like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration with similar characteristics and clinical signs (Meij and Bergknut, 2010a). Owners of dogs may report unilateral or bilateral lameness or paresis/paralysis, toe dragging, low tail or neck carriage, difficulties with rising, sitting or lying down, reluctance to jump or climb, urinary or faecal incontinence, and hyperesthesia or self-mutilation (Meij and Bergknut, 2010b). In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs (Bergknut *et al.*, 2012a). Given that, not only on a clinical levels, but also on a histological, biochemical, and radiological level IVD degeneration in canines is similar to human, the dog is considered to be a suitable animal model for human IVD degeneration (Bergknut *et al.*, 2012b). As such, this project employs experimental dogs as a last step to translate new treatment strategies towards canine and human patients with IVD disease.

The healthy IVD provides flexibility to the spine and consists of a gelatinous nucleus pulposus (NP) and fibrous annulus fibrosus (AF). During IVD degeneration, the glycosaminoglycan (GAG) and water content of the NP decreases. Because of the changed IVD matrix, diffusion of nutrients becomes impaired, which further deteriorates the health of the IVD cells and healthy matrix synthesis. Since the avascular IVD exhibits inadequate matrix repair, a vicious circle develops in which the IVD weakens and experiences increased vulnerability to damage by physiologic loading (Bergknut *et al.*, 2013, Colombini *et al.*, 2008). Besides, typical large, vacuolated notochordal cells (NCs) are replaced by smaller, non-vacuolated chondrocyte like cells (CLCs) in the NP during early IVD degeneration (Bergknut *et al.*, 2013).

Current treatment for back and neck pain in both humans and dogs is mostly palliative and consists generally of pain relief by oral administration of analgesics and anti-inflammatory drugs, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Patients with late stage disease and refractory to pain medication can only be treated surgically. Both in dogs and humans, this is primarily done by arthroplasty or by removing the IVD and fusing the two vertebrae by means of bone regeneration (Freemont *et al.*, 2002, Smolders *et al.*, 2012). These surgical treatment strategies demand long term recovery, do not lead to full recovery, and do not support a biological and hence functional repair of the diseased joint. Therefore, there is substantial interest in new regenerative therapies that repair the degenerated IVD and restore its function (Bach *et al.*, 2014c, Li *et al.*, 2015, Sakai and Andersson, 2015). These treatment strategies address the disease at earlier stages in order to prevent the need for heavy demanding surgery. Besides genetic predisposition, several factors can be the initiators of IVD degeneration, including ageing, abnormal biomechanical loading, and impaired

nutrition. Regardless of the initiating factor, IVD degeneration is mediated by inflammatory processes (Molinos *et al.*, 2015). Given that we cannot address the primary cause of IVD degeneration in all cases, treatment strategies concentrate on effective pain management and treatment at an earlier stage to prevent heavy demanding surgery. The project aims at controlling inflammation and by providing anabolic stimuli to restore the IVD homeostasis and achieve regeneration. This project encompasses two arms: a basic and a translational one. In the basic research arm, we identify potential new bioactive substances to be implemented in treatment strategies by mimicking developmental biology. The promising bioactive substances are further developed and validated by means of *in vitro* studies and the use of small animal models (mice and rats) before they are being further translated into a large animal model. In the translational research arm, potent anti-inflammatory and regenerative bioactive substances for the treatment of IVD degeneration are being evaluated for their efficacy in a large animal model (dog).

Thus far, there have been at least two bioactive substances identified: caveolin-1 and Link-N either or not in combination with the intradiscal transplantation of mesenchymal stem cells. These two substances will be addressed over the course of this proposal.

Caveolin-1: The membrane protein caveolin-1 may be regarded an exciting target for developing strategies for IVD regeneration. Advantageous effects of caveolin-1 have been demonstrated in several tissue types (Baker and Tuan, 2013, Haines *et al.*, 2011, Head *et al.*, 2011, Tourkina *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2011). It is essential for the structural integrity and function of caveolae (flask-shaped invaginations of the plasma membrane) of many differentiated cell types (Baker and Tuan, 2013, Dai *et al.*, 2006, Heathfield *et al.*, 2008, Mercier *et al.*, 2009, Okamoto *et al.*, 1998, Zou *et al.*, 2011) and is involved in endocytosis, the formation and transport of caveolae, cell adhesion and migration (Hulit *et al.*, 2000). Moreover, caveolin-1 is implicated in cell cycle regulation, senescence and apoptosis (Gvaramia *et al.*, 2013). In addition, as a scaffolding protein, it functionally regulates signal transduction of various signaling pathways (Okamoto *et al.*, 1998, Zou *et al.*, 2011). We have already shown that early canine IVD degeneration involves a down-regulation of caveolin-1 expression and that caveolin-1 is needed for the maintenance of a healthy NP phenotype in mice (Smolders *et al.*, 2013b). This project aims to further elucidate the role of caveolin-1 in IVD degeneration and regeneration. If proven to be promising, *in vivo* studies will be conducted in small animal models for safety and dose finding (rat IVD model) prior translation to a large animal model (dog)

Link-N: Link N (a 16 amino acid peptide) is a proteolytic fragment of link protein, an important cross-linker and stabilizer of the major structural components of cartilage: aggrecan and hyaluronan. Link N exerts its anabolic effects on human and bovine CLCs (Abbott *et al.*, 2013, Mwale *et al.*, 2003) and intact human IVDs *ex vivo* (Gawri *et al.*, 2013) via signaling through the BMP type II receptor (Wang *et al.*, 2013). A single Link-N injection in a (annular needle punctured) degenerated rabbit IVD stimulated aggrecan and down-regulated metalloproteinase expression. In addition, the IVD proteoglycan content tended to increase and disc height improved after 12 weeks (Mwale *et al.*, 2011). Being a synthetic peptide, Link-N has considerable financial benefits for clinical use over recombinant growth factors, because it is extremely cheap to produce. We have recently shown *in vitro* that only AF cells, and not CLCs, have the ability to proteolytically process the Link-N peptide resulting in a fragment spanning amino acid residue 1-8 [REDACTED] (Gawri *et al.*, 2014). The biologically active sequence is preserved within this fragment (Gawri *et al.*, 2014); [REDACTED]

[REDACTED] and more likely to attract investment for clinical trials in canine and human patients because it has recently been filed for a patent ([REDACTED] Patent published).

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

3.2 Purpose

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

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

Overall aim: to develop new treatment strategies for disc degeneration by mimicking developmental biology.

Key objectives:

1. Develop medium to high throughput functional assays to identify the biological potency of identified targets with anti-inflammatory and regenerative properties, including peptides like caveolin-1 and the N-terminus of Link protein (Link-N), miRNAs, and other bioactive factors emerging from key objective 3. This objective will help determine the exploitation potential of the selected bioactive substances towards regenerative treatment strategies for IVD disease.

Why is this achievable: A readily available mouse model is employed (Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrecht). The research group has experience with the cell lines employed, isolation of pure chondrocyte populations and the micro-aggregate culture systems (Bach *et al.*, 2014a, Bach *et al.*, 2015). Primary CLCs from both species are readily available through the Biobank and read out parameters are up and running.

2. Delineate the role of Caveolin-1 in disc (patho)physiology.

Why is this achievable: The Caveolin-1 KO mice and wild type mice on the same background are readily available at the facilities of the GDL. Preliminary studies have been conducted on the basis of an earlier DEC application (2011.III.12.121) and reveal that *in vivo* knockout of caveolin-1 induces apoptosis, and hence leads to lower NP cell numbers during aging. These results altogether indicate that caveolin-1 is implicated in NC-(patho)physiology.

3. Identify bioactive targets secreted by notochordal cells that have a regenerative capacity with the aid of key objective 1 and translate this towards human and canine patients with the aid of small and large animal models.

Why is this achievable: We have already demonstrated *in vitro* that conditioned medium from NCs has a regenerative effect regardless of the species employed (NCs from porcine or canine tissue) on human CLCs isolated from degenerated IVDs (Bach *et al.*, 2015). The latter ensures the translational capacity of this objective to the canine and human species, both suffering from IVD disease. Even more so, we have shown that the NC-conditioned medium achieves regenerative effects in NP tissue explants, indicating that this effect is also present in a degenerated NP environment (de Vries *et al.*, 2014).

4. Translate mesenchymal stem cell (MSC)- and/or growth factor based treatment strategies for disc disease in large animal models.

Why is this achievable: A combinatory treatment of bioactive substance with transplanted MSCs may be a more suitable strategy for treating severely degenerated IVDs. This strategy targets the decreasing cell numbers and the catabolic and inflammatory IVD environment by the transplanted MSCs, while the bioactive substance provides an anabolic stimulus to the resident CLCs and the chondrogenically differentiated MSCs. This strategy is achievable given that (a) multiple studies with experimental animals have been conducted; MSCs transplanted intradiscally demonstrated a regenerative effect and resulted into increased disc height in a meta-analysis (Wang *et al.*, 2015, Yim *et al.*, 2014); (b) one of the first targets to be investigated will be Link-N which has been shown to exert anabolic effects on human degenerated CLCs (Abbott *et al.*, 2013), in intact human IVDs *ex vivo* (Gawri *et al.*, 2013), and *in vivo* in a rabbit annular needle puncture model of IVD degeneration (Mwale *et al.*, 2011).

5. Demonstrate safety and efficacy of sustained release of the identified bioactive substance by injectable biomaterials loaded with the bioactive substance.

Why is this achievable: from a technological perspective, the research group has gained experience with several biomaterial platforms that effectuate sustained release of the loaded substance, including small molecules and peptides. These studies have been performed in large animal models that are implemented in the current project. Furthermore, we have active collaboration with companies developing these platforms within the context of other ongoing projects. From a biologic perspective, there are several examples in literature showing the additive value of sustained release of growth factors or anti-inflammatory factors over a single injection (Schutgens *et al.*, 2015).

3.3 Relevance

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

Social relevance

Human aspect: Although seldom a cause of morbidity, diseases of the musculoskeletal system impose a substantial burden on Western societies that is increasing with ageing of the population (Katz, 2006). Amongst the diseases with most impact is chronic low back pain. Low back pain has been identified as one out of seven high burden conditions by the 2013 Report Priority Medicines for Europe and the World, which identifies key areas of priority research for pharmaceutical innovation to meet public health needs. In a special barometer report exploring health in EU citizens, the most common type of pain restricting daily activity was low back pain (Vos *et al.*, 2012). It is one of the ailments with the largest number of years lived with disability. Patients with late

stage disc disease and pain refractory to medication can only be treated surgically. Between 150 and 200 thousand spinal surgeries are performed annually in the EU. For human patients with severe IVD disease, surgical procedures such as disc excision and vertebral fusion lead to pain relief in the short-term, but they alter spine biomechanics, leading to further degeneration of surrounding tissue and adjacent discs. Failure rate for lumbar fusions is 20% to 40% after five years. Surgical procedures that maintain spine biomechanics, i.e. arthroplasty, have limited longevity and sufficient long-term follow up to determine effects on adjacent structures, e.g. facet joints, is lacking. Furthermore, arthroplasty revisions are challenging and associated with higher morbidity and costs. *Veterinary aspect:* many dogs suffer from the clinical consequences of IVD degeneration, and IVD disease is a relatively common reason for euthanasia (Smolders *et al.*, 2013a). Conservative and surgical therapies may resolve neurological deficits and reduce pain (although in many cases insufficient), but they do not lead to repair of the degenerated IVD. In fact, long-term medication can cause side-effects, surgery can lead to spinal instability and adjacent segment disease, and recurrence of IVD disease may occur (Bach *et al.*, 2014b).

Scientific relevance

The current project aims at treating chronic neck and low back pain associated with intervertebral disc disease, by inhibition of tissue degeneration and enhancing intrinsic regeneration. Although the widespread use of anti-inflammatory oral medication in chronic low back pain is justifiable, their application is accompanied by several drawbacks. First of all, the route of administration is usually systemic, which entails several side effects, including gastrointestinal side effect and for some drugs even cardiotoxicity. Therefore, local administration is a logical approach. The incorporation of drugs into controlled release carriers for local application will circumvent systemic side effects. Even more so, local sustained release of medication will avoid multiple intradiscal injection, which could induce further degeneration. Based on the basic research part, the proposed project will identify (new) mediators that are crucial in matrix production and inflammation control and hence can be implemented to both degenerative joint and disc disease. Furthermore, it will give insight into the interplay of inflammation and regeneration, into the role of MSCs in biologic repair, into the additive regenerative effect that an advanced treatment strategy may engage where transplanted MSCs are combined with growth factors.

3.4 Research strategy

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

This project encompasses two arms: a basic and translational one.

A) In the basic research arm, we identify potential targets by mimicking developmental biology. The promising targets are further developed and validated in *in vitro* studies and small animal models (mice and rats) before they are further translated into a large animal model.

Rationale: The young and healthy IVD contains NCs which secrete factors that are essential for the formation and maintenance of the IVD; NC loss is speculated to relate to the initiation of IVD disease. Only recently, NC-conditioned medium has been identified as a promising strategy with anti-inflammatory and regenerative properties (de Vries *et al.*, 2014, Korecki *et al.*, 2010, Potier *et al.*, 2014, Purmessur *et al.*, 2011). Unravelling the [REDACTED] of the NC-secretome will form the basis for the development of effective therapeutic strategies for IVD disease. Furthermore, [REDACTED] profiling of the canine IVD during the onset of degeneration has identified several potent targets. These ongoing "Omic" studies, result into enormous data sets of differentially regulated genes/protein. The data sets are further narrowed down based on medium to high throughput *in vitro* functional assays. Thereafter, transgenic mice are implemented that carry reporters in the promoter region of genes relevant to cartilage regeneration in order to have a translational step from cell lines to the final validation with canine and human primary cells.

B) In the translational research arm, potent candidates are evaluated for their efficacy and safety in a large animal model (dog). The translational arm concentrates on development and translation of MSC and/or growth factor-based treatment strategies.

Rationale: Multiple growth factors have been identified to induce an anabolic response in small animal models with induced IVD degeneration. Thus far, only Growth Differentiation Factor-5 (GDF-5) is being evaluated in human clinical trial phase I/II. There are ongoing clinical trials where immunoselected allogenic MSCs are being evaluated in a phase I/II. For both growth factors and transplanted MSCs, the results are promising, but are limited to halting the

process of degeneration rather than inducing regeneration with improvement of the IVD height and water content. However, with increased severity of IVD degeneration, the inflammatory activity increases, NP cell numbers decrease and cells become senescent (Heathfield *et al.*, 2008). Hence, bioactive substance (like growth factors) may be ineffective. This indicates that a combinatory treatment of bioactive substance with transplanted MSCs may be a more suitable regenerative strategy for treating severely degenerated IVDs: transplanted MSCs target the decreasing cell numbers and the catabolic/inflammatory IVD environment, while the bioactive substance stimulate the resident CLCs and chondrogenically differentiated MSCs. In case a single growth factor injection is not sufficient to achieve the regenerative effects, sustained release will be pursued with injectable biomaterial platforms.

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

Key objective 1: Medium to high throughput *in vitro* functional assays to identify the biological potency of identified targets. This objective will also help determine the exploitation potential of the selected bioactive substances towards regenerative treatment strategies for IVD disease.

Approach: A three-stage approach will be set up in order to narrow down the targets derived from “-omics” studies, with focus on matrix production and inflammation control, and reduce the number of animals employed. The first stage is animal-free and employs an established cartilage cell line, the ATDC5. (Bach *et al.*, 2014b) ATDC5 are retrovirally transduced with a vector encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) driven by the human collagen type 2 promoter to monitor chondrogenesis. Given eicosanoids formed via the cyclooxygenase (COX) pathways are major players in various inflammatory and degenerative disorders, COX-2 activity will be determined by a colorimetric method after initial stimulation by a range of TNF α /IL1 concentrations. A subset of the targets will be studied in the second stage in primary chondrocytes isolated from transgenic mice harboring a fluorescent reporter based on collagen 2. (Bach *et al.*, 2014b, Tryfonidou *et al.*, 2011) These mice enable isolation of a pure population of proliferating chondrocytes. In this *in vitro* model chondrogenesis and inflammation control will be studied in micro-aggregates in the presence of the selected library of peptides and/or miRNAs based on the observed biologic effects in stage 1. The most promising targets will be functionally studied/validated in the third animal-free stage over a longer period of time in a 3D-culture. Herein primary human and canine CLCs isolated from degenerated discs readily available through the Biobank will be used, as a last translational step towards the follow up *in vivo* studies. Transcription factor-miRNA-target gene networks associated with IVD health will help determine miRNA master regulators that will be validated by mechanistic miRNA studies.

Key objective 2: Delineate the role of caveolin-1 in IVD (patho) physiology. This objective is a collaborative project with the University of Hong Kong and the Tokai University School of Medicine and is supported with funding by the AO Spine Research Network.

Approach: We will characterize the IVD phenotype and the concomitant changes in signaling pathways related to IVD degeneration/regeneration during the development of the NP (prenatal) and during aging (postnatal) of caveolin 1 KO and WT mice with similar genetic background. These studies will be conducted employing the following techniques: [REDACTED] and immunofluorescence/histochemistry of relevant proteins.

Key objective 3: Identify bioactive targets secreted by NCs that have a regenerative capacity and translate this with the aid of the rat model where IVD degeneration is induced with aid of puncture. This is an objective that we address in collaboration with Prof. dr. [REDACTED] (TU Eindhoven) and dr. [REDACTED] (UMC Utrecht).

Approach: We are at the process of further determining which protein(s) are responsible for the anabolic CLC response (mass spectrometry). After identification, these proteins will be synthesized and tested *in vitro* both on cells (described under key objective 1) and on tissue explants for their biological potency. The most promising candidates will be tested - either alone or in combination with transplantation of MSCs - in a rat model where degeneration is induced by puncture in tail IVDs. This small animal model is employed as a first step of translation with specific objectives safety and dose finding. Only if these candidates appear to be safe and efficient in inducing a regenerative response, the selected bioactive substance will be further translated in a large animal model (dog).

Key objective 4: Translation of MSCs and/or bioactive substances based treatment strategies for IVD disease in large experimental animal model. Bioactive substances as identified under objective 3, validated for the potency based on studies done under objective 1&3 will be further developed to demonstrate their biological potency in a proof-of-concept large animal model as the last pre-clinical step in the translation process before moving on to

clinical trials in canine and human patients.

Approach: One of the promising bioactive substances with regenerative potential, the N-terminus of Link protein (Link-N) will be studied at the initiation of the project. Link-N is addressed in collaboration with [REDACTED] (TU Eindhoven & UMC Utrecht) and [REDACTED] (Orthopaedics Research LAB McGill University, Lady Davis Institute, Montreal, Canada). Other bioactive substances identified over the course of the project will be addressed in a similar manner. The regenerative effects of the bioactive substance alone or in combination with MSC transplantation will be studied in the canine model of mild and severe IVD degeneration by means of longitudinal quantitative MR imaging followed by post mortem biomolecular, biochemical, and histological measures.

Key objective 5: Demonstrate safety and efficacy of sustained release of the bioactive substance by injectable biomaterials loaded with the bioactive substance.

Approach: If a second injection of the bioactive substance (e.g. Link-N or [REDACTED] key objective 4) appears to have an additive regenerative effect over a single injection in vivo in the experimental animal, the bioactive substance will be incorporated in an injectable biomaterial platform that effectuates sustained release over a prolonged time period. The word "platform" is used here as many biomaterials can be used in different forms, e.g. as solid scaffolds, hydrogels or microspheres. In this project, only injectable biomaterials will be used; scaffolds are not applicable here. Typical biomaterial forms used in this study are microspheres and hydrogels. At this stage, the biomaterial platform cannot be specifically defined given that we have to determine which platform is best suitable for the chosen bioactive substance based on its chemical properties. This is determined in collaboration with industry. As soon as *in vitro* sustained release of the bioactive substance is achieved and the necessary work has been conducted to prove safety (cytotoxicity, *in vitro* studies on the anabolic effects of sustained release of the bioactive substance compared with a single bolus treatment), a dose-response study will be conducted in a validated rat model where IVD degeneration is induced in the tail by needle puncture.

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

This project aims at biological repair of the diseased IVD by combining basic and translational research. The coherence between the different components of the project is also illustrated in the supplemented figure (Appendix of the proposal).

With the aid of basic research, technological tools are developed to validate promising targets (key objective 1). One of these promising targets, readily identified by means of an "omic" study, i.e. caveolin-1 (key objective 2), is further explored with KO and WT mice with the same background. Key objective 3 studies the regenerative bioactive substances present within NC-conditioned medium. As soon as the proteomic analysis has been completed, the set of promising targets will be further studied with the medium throughput platform developed under key objective 1. Targets with proven regenerative and anti-inflammatory capacities will be selected for further translation with aid of a rat model where IVD degeneration is induced in the tails IVDs by needle puncture. In parallel, key objective 4 concentrates on translating readily identified targets into a large animal model (dog). Note that such targets already have proven to be effective by us or others in small animal models. A readily available bioactive substance, Link-N will be studied within the course of the first year of the project. In the follow up period of the project, only bioactive substances that have been shown to be safe and have a regenerative effect at least in small animal models (by others or within this project under key objective 3) will be employed. If it appears that sustained delivery of the bioactive substance has advantages over a single injection, a biomaterial platform will be developed that effectuates sustained release of the bioactive substance (key objective 5). After safety has been proven *in vitro* (cytotoxicity, studies on the anabolic effects of sustained release of Link-N compared with a single bolus treatment), a dose-response study will be conducted in the rat model. After dose finding, the developed regenerative strategy is further translated in a large animal model (dog) before further translation in a phase I clinical study in canine and human patients.

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

Serial number	Type of animal procedure
---------------	--------------------------

1	Isolation of primary pd2EGFP+ chondrocytes from Col2-pd2EGFP reporter mice
2	Studying the IVD phenotype of Caveolin-1 KO mice
3	Rat model with induced IVD degeneration
4	Canine model of IVD degeneration (mild and severe degeneration)
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Universiteit Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Isolation of primary pd2EGFP+ chondrocytes from Col2-pd2EGFP reporter mice

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This project aims to develop medium to high throughput functional assays to identify the biological potency of identified targets. This objective will also help determine the exploitation potential of the selected bioactive substances towards regenerative treatment strategies for intervertebral disc (IVD) disease. A readily available mouse model is employed (Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrecht; Tryfonidou et al., 2011). The research

group has experience with the isolation of pure chondrocyte populations and the micro-aggregate culture systems (Bach et al., 2014) of primary pd2EGFP chondrocytes. In this respect, mice are euthanized and post-mortem all cartilaginous tissues are collected, digested and thereafter pd2EGFP-positive chondrocytes are collected by means of cell sorting (FACS).

References:

Bach FC, Rutten K, Hendriks K, Riemers FM, Cornelissen P, de Bruin A, Arkesteijn GJ, Wubbolts R, Horton WA, Penning LC, Tryfonidou MA (2014) The paracrine feedback loop between vitamin D(3) (1,25(OH)(2)D(3)) and PTHrP in prehypertrophic chondrocytes. J Cell Physiol 229: 1999-2014.
Tryfonidou MA, Lunstrum GP, Hendriks K, Riemers FM, Wubbolts R, Hazewinkel HA, Degnin CR, Horton WA (2011) Novel type II collagen reporter mice: New tool for assessing collagen 2α1 expression in vivo and in vitro. Dev Dyn. Mar;240(3):663-73.

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

Female and male col2-pd2EGFP reporter mice are not subjected to experimental procedures; they are being euthanized at the designated age (1 week old) to collect the cartilaginous tissues. These experiments are planned in such a way, that the back-up colony is maintained with a low breeding profile (i.e. 2-3 breedings pairs), and only when tissues are needed, more breeding pairs are formed.

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

The generation of off-spings cannot be subjected to statistical power analysis. In order to minimise the number of animals the following considerations have been done:

- (1) mice are being euthanized at the designated age that gives the highest yield of primary chondrocytes
- (2) chondrocytes are stored at P0. Approximately, 1 million P0 chondrocytes are harvested per mouse. In vitro experiments are primarily performed with P2 cells and per 1 million P0 cells 6 million P2 cells are generated after monolayer expansion. At P2 the cells are cultured in high-density micro-masses that induces their re-differentiation in the chondrocytic lineage.

B. The animals

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

We have imported the mice from the Shriners Children Hospital, Portland, Oregon. We [REDACTED]. The planned studies have not been conducted before. Other available chondrocyte cell lines that have been shown not to perform properly for studies in cartilage biology. Isolation of pure chondrocyte populations from mice is challenging on the basis that mice are too small for accurate dissection of the cartilaginous tissues. This is overcome by the col2-pd2EGFP reporter mice. These mice carry a pd2EGFP in the collagen 2 promoter. When collagen 2 is transcribed, then also pd2EGFP is produced; the latter is visual in fluorescence and confocal imaging and can be employed to sort the pd2EGFP positive cells. Even more so, the pd2EGFP is characterized by a short half life of 2 hrs, and hence only cells with active transcription of collagen 2 are isolated and imaged. This mouse strain enables the development of medium to high throughput functional assay employing primary chondrocytes, rather than the available cell lines, that do not possess the proper cartilage characteristics.

Can the results from these experiments be translated to humans and other species? This animal model is used as a second step to further narrow down the targets employed before further in vitro experiments are performed with primary cells from humans and canines. Mouse models are being extensively used as a model to translate results/understand pathophysiologic mechanisms in vivo. The model employed in this project is novel. However, pd2EGFP-chondrocytes have been employed before to study chondrocyte (patho)physiology and have been shown to respond in a similar manner to external stimuli (Bach et al. 2014).

Adult female and male mice are employed for breeding, their offsprings are euthanized at the age of 1 week to isolate pure population of primary chondrocytes. Mice at the age of 1 week have been chosen on the basis that (a) cartilaginous structures can be dissected under the stereoscoop with magnification, (b) the cartilaginous skeleton at this age is very active, and hence most of the chondrocytes express the pd2EGFP and thereby high yields of chondrocytes per mouse are achieved.

In this project we will set up the medium throughput functional assay based on the pd2EGFP-chondrocytes. In the first and second year of the project we expect to need 25 mice/year; thereafter it is estimated that 10 mice per year will be needed to run the functional assays. A total of 80 mice will be used. These will be generated from breeding pairs of female and male mice, estimated to be 2-3 pairs in the first two years and 1-2 pairs per year for the last three years of the project.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: This objective relies on a three-stage approach. In the first stage, an established cell line is being employed in order to narrow down the initial set of bioactive substances (this supports the reduction of experimental animals used). In the second stage of the approach, a readily available mouse model is employed (Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrecht).

Reduction: in vitro experiments are done primarily with P2 cells, which leads to reduction of the initial animals needed to generate the numbers of chondrocytes needed to run the experiments. Furthermore, the in vitro system has been down-scaled and from each micro-mass several read out parameters can be deduced leading to reduction of the micro-masses needed per bioactive substance to evaluate its biological activity. Automated image acquisition will concentrate on the short term differentiation (7 days) to monitor aggregate size and quantify intracellular pd2EGFP expression. Biochemical measurements of GAG and DNA content will allow determination of matrix deposition.

Refinement: This model is a unique model enables the isolation of pure populations of chondrocytes from mice. Furthermore, it relies on the expression of pd2EGFP, which has a short half life, and thereby only chondrocytes are detected in culture that actively transcribe collagen 2. This enables us to identify the biological potency of the targets that are being tested in the in vitro platform in a fast and reliable way.

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

Animals are housed in litters, after the age of 3 weeks male and female mice are grouped separately and grouped when breeding is initiated. The animals are not subjected to experimental procedures until they are killed.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question 1.

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

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

☐ Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

None

Explain why these effects may emerge.

not applicable

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

During the period before the animals are killed (breeding pairs, offspring) general clinical signs are observed. If clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect the growing cartilaginous tissues

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Universiteit Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Studying the IVD phenotype of Caveolin-1 KO mice

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Preliminary studies have conducted on the basis of an earlier DEC application (2011.III.12.121) and have shown that caveolin-1 KO mice have an IVD phenotype. Caveolin-1 plays a crucial role in preservation of murine notochordal cells (NCs), underscored by the IVD phenotype of 3-month-old caveolin-1 KO mice (Smolders et al., 2013). The nucleus pulposus (NP) of WT mice contained numerous viable NCs, whereas the NP of caveolin-1 KO mice contained

abundant chondroid-like matrix with relatively few, mainly apoptotic, chondrocyte-like-cells similar to a degenerating NP. Furthermore, preliminary studies reveal that in WT mice NC numbers did not considerably change during ageing, whereas NP cell numbers of caveolin-1 KO mice decreased over time. The proportion of positively stained TUNEL cell nuclei (TUNEL ratio) was significantly higher in NPs of caveolin-1 KO mice than in NPs of WT mice. This indicates that in vivo knockout of caveolin-1 induced apoptosis, and hence lead to lower NP cell numbers during aging. These results altogether indicate that caveolin-1 is implicated in NC-physiology and may have a role not only in preserving the NC-population but also play a role in the activation of the resident progenitor cells.

In order to further understand the IVD phenotype of caveolin-1 KO mice and thereby determine the role of caveolin-1 in IVD physiology and IVD degeneration, pre-natal and post-natal mice will be studied. On the basis that IVD are formed during the period of E14-E15, prenatal embryo of this age will be sacrificed. In the postnatal period, mice of the following age will be investigated, at 3 and 6 weeks of age, and at 3, 6, and 9 months of age. Where possible surplus mice will be used for this purpose. The latter is applicable to post-natal mice, where for example mice at the age of 3, 6, and 9 months that have been used for breeding are killed.

Reference:

Smolders LA, Meij BP, Onis D, Riemers FM, Bergknut N, Wubbolts R, Grinwis GC, Houweling M, Groot Koerkamp MJ, van Leenen D, Holstege FC, Hazewinkel HA, Creemers LB, Penning LC, Tryfonidou MA (2013) Gene expression profiling of early intervertebral disc degeneration reveals a down-regulation of canonical Wnt signaling and caveolin-1 expression: implications for development of regenerative strategies. *Arthritis Res Ther* 15: R23.

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

Female and male Caveolin-1 KO mice and WT mice on the same genetic background are not subjected to experimental procedures; they are being euthanized at the designated ages to collect the spine. Initially, 3 mice of each sex and each age category will be collected and studied. Thereafter, additional mice will be purposely bred to extend the studies for a specific age-category. These experiments are planned in such a way, that the back-up colony is maintained with a low breeding profile (i.e. 2-3 breeding pairs), and only when IVDs are needed, more breeding pairs are formed.

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

These in vivo experiments cannot be subjected to statistical power analysis. In order to minimise the number of animals the following considerations have been done:

(1) The caveolin-1 KO mice have a very distinct IVD phenotype at the age of 3 months characterized by (a) a phenotypic change in the cell-type: chondrocyte like cells are present and notochordal cells have disappeared, (b) biochemical composition: matrix very rich in collagen type 2 and glycosaminoglycans (GAG), (c) more cell apoptosis. The latter has been quantified in mice of three different ages, i.e. at 6 weeks, 3 months and 6 months and has been employed to calculate the Cohen's d size effect: it increases with increasing age, being 1.3 at 6 weeks and 4.1 at 6 months. The observed variance was 10-15% in each studied age.

(2) Given the distinct differences in IVD phenotype, mice are being euthanized at designated ages (n=3 per sex and per age) in order to identify which age categories are the ones that need further studying and additional mice are needed to cover for the biologically relevant variance.

(3) From each collected spine, we can determine all read out parameters indicating that each mouse contributes as an individual to all the parameters determined. The lumbar spine is employed for histopathological and immunohistochemical analysis, while the cervical spine is employed for biomolecular analysis. With regard to the latter, it is within the scope of the project to collect NP tissue from caveolin-1 KO and WT mice, isolate the NP and subject it to RNAseq analysis (technique up and running in mice in collaboration with [REDACTED], Honk Kong University)

B. The animals

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

The caveolin-1 KO mice and the WT mice on the same genetic background are readily available at the facilities of the GDL. A broad range of life ages has been chosen in order to cover the development of the IVD, its maturation, and follow the degeneration process at later ages.

How relevant are these experiments for humans and other species? By understanding the *in vivo* role of caveolin-1 in IVD (patho)physiology we will be able to further develop and fine-tune regenerative treatment strategies based on caveolin-1. In this respect, based on preliminary *in vitro* studies, there is evidence that the supplementation of caveolin-1 using a peptide that encodes for the scaffolding domain of caveolin-1 and thereby mimics the biologic actions of caveolin-1, results in a matrix anabolic response in disc cells isolated from degenerated IVDs. Furthermore, based on studies with caveolin-1 KO mice it has been shown that caveolin-1 has a strong anti-inflammatory role (in a model of lung infection) indicating that it may also play a role as an anti-inflammatory mediator in the degenerative process of the IVD.

In order to further understand the IVD phenotype of caveolin-1 KO mice and thereby determine the role of caveolin-1 in IVD physiology and IVD degeneration, pre-natal and post-natal mice will be studied. On the basis that IVDs are formed during the period of E14-E15, prenatal embryos of this age will be sacrificed. In the postnatal period, mice of the following age will be investigated, at 3 and 6 weeks of age, and at 3, 6, and 9 months of age. Three female and 3 male mice of each age category will be studied. Based on the planned experiments and questions that need to be addressed, we expect to use approximately 35 mice per strain in the 1st year; and thereafter 20 mice per strain /year for the remaining 4 years. That is a total of 230 for both caveolin-1 KO and wild type mice.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: *In vitro* studies with primary NP cells collected from canines euthanized for other unrelated experiments are done in order to perform functional studies on the role of caveolin-1 in IVD degeneration and regeneration. The caveolin-1 KO mice are employed in order to understand the role of caveolin-1 *in vivo*, where all signalling pathways are present and may interact with each other. Caveolin-1 has a tissue- and context-dependent effect and thereby *in vivo* studies with these mice cannot be replaced with *in vitro* experiments.

Reduction: For the later life stages, surplus mice that have been employed for the "back up" breeding of both colonies will be used as much as possible. Furthermore, further reduction of the animals used is achieved by collaborating [REDACTED], who uses the same mouse strains for studies on liver lipodosis & regeneration. In this way, terminal experiments performed on studies regarding the liver, are notified to us and we collect the spines of the mice for further analysis.

Refinement: from each mouse spine, several read out parameters are achieved, including histology, biomolecular and biochemical analysis of the IVDs.

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

Animals are housed in litters, after the age of 3 weeks male and female mice are grouped separately to prevent unplanned breeding. The animals are not subjected to experimental procedures until they are killed.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question 1.

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

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

☐ Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

None

Explain why these effects may emerge.

not applicable. The absence of caveolin-1 is related to a pulmonary and cardiovascular system phenotype. Several other systems are also affected, including muscles, skeletal system and the immune system. Thus far, there have been no clinical signs related to IVD disease in mice of older age, i.e. at the age of 6 months. Based on reports from the Jackson laboratories, caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.

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

Caveolin-1 KO mice have increased susceptibility to bacterial infection and related morbidity. In order to minimize the risk for infection and morbidity mice are maintained in the SPF or in filter-top cages.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

During the period before the animals are killed (breeding pairs, offspring) general clinical signs are observed. If clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized.

Indicate the likely incidence.

Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.

K. Classification of severity of procedures

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

mild; Thus far, there have been no clinical signs related to IVD disease in mice of older age, i.e. at the age of 6 months.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

in order to collect the spines and study the IVD phenotype

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Universiteit Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure Rat model with induced IVD degeneration

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Rats are allowed to acclimatize for at least 1 week and thereafter the experiments are initiated. Four weeks before the initiation of the study, the caudal IVDs are punctured in a minimally invasive manner under fluoroscopic guidance and general anesthesia. Degeneration of the caudal IVDs occurs over the course of 4 weeks and is confirmed by means of radiography 4 weeks after induction. In studies where mesenchymal stem cells (MSCs) are employed: prior to

treatment, other rat donors are sacrificed to collect and expand MSCs. These MSCs will be expanded in the laboratory until Passage 1 and thereafter properly biobanked. For this purpose, surplus rats from the same strain are being employed, if available. MSCs are biobanked so that only a limited number of animals is needed to create the necessary population of MSCs.

At T=0 (start of the treatment), the bioactive substance and/or MSCs will be injected into the rat caudal IVDs on the side contralateral to the annular puncture. All injections will be done under general anesthesia and under fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection. At T=3 months after injection of the bioactive substance and/or MSCs, the in vivo experiment will be terminated; rats will be euthanized.

Read out parameters

In vivo:

Potential regenerative effects will be studied by obtaining conventional radiographic images at T=-4 weeks prior to induction of degeneration (under sedation), at T=0 (time of treatment, under sedation), at T=3 months (directly post-mortem). The primary read out parameter is the percentage of change of the Disc height Index (DHI) for each IVD.

Post-mortem:

a. Radiography and micro-computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors and/or MSCs.

b. Thereafter, rat tails will be harvested and further divided in spinal units ($\frac{1}{2}$ vertebra – endplate – IVD – endplate – $\frac{1}{2}$ vertebra). IVDs will be accordingly processed for biochemical analyses of the NP and AF separately and/or after macroscopic evaluation will be fixed, decalcified, and thereafter subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and immunohistochemical stainings). Each IVD can either be employed for biochemical, or biomolecular or histopathological analysis.

c. In experiments where the MSC fate at 3 months needs to be determined, [REDACTED] rats are employed for the in vivo experiment and [REDACTED] donors are employed for MSCs. In this way, in [REDACTED] IVDs the presence of [REDACTED] DNA can be studied by means of qPCR. Cell tracking of male DNA is achieved by up and running qPCR for the presence of [REDACTED] corrected for housekeeping reference genes like GAPDH expression. Given that there is no specific gene for [REDACTED] cell tracking experiments can only be set up in this combination ([REDACTED] rat recipient, [REDACTED] rat donor)

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

IVD degeneration is induced in caudal IVDs of rats under general anesthesia and proper analgesia. In total the procedure will take about 30-45 minutes and estimated to be of mild severity.

Degeneration of the caudal IVDs occurs after a single puncture. Over the course of 4 weeks degeneration progresses and is confirmed by means of fluoroscopy under general anesthesia 4 weeks after induction (Zhang et al. 2011). The severity of the procedure is mild.

All strategies employed within this project rely on the employment of minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle, in which the bioactive substance alone, or loaded on a biomaterial that effectuates sustained release of the bioactive substance is injected once. The volume injected in each IVD is adapted in order not to induce IVD degeneration (Mao et al., 2011). In this way, the injectable treatment itself does not disturb the balance of the IVD. In studies of biocompatibility/safety, duration of the treatment is limited to 4 weeks after application of the injectable treatment, while in studies where also efficacy is studied, the duration of the study is 3 months after application of the injectable treatment. In the studies of efficacy, a first experiment explores a dose-range, in which 3 different dosages are being tested for safety and efficacy on a relatively short term (4

weeks) and after the ideal dose has been determined a final experiment is conducted where efficacy is studied with 3 months follow up. The severity of this procedure is mild.

References

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

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

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: disc height index. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.008 ($\alpha=0.05 / 5$, in case of much number of treatment groups to be studied), and assuming standard deviations as observed in previous studies: in the rat degenerative disc model in which variation of 15% was observed after induction of IVD degeneration and a variation of 15-20% was observed after injection of a bioactive substance with a significant biologic effect, 4 IVDs is the minimum IVDs in each group to observe significant differences. On the basis that degeneration may fail to occur in a disc, we have included an additional IVD in each group.

In order to minimize the number of animals employed per study and to minimize the "RAT" effect as random effect, we employ a block design of the study. Hence, based on power analysis, 10 rats would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal fluoroscopy and post-mortem biochemical (n=5 rats), and histological analysis (n=5 rats). When biomolecular analysis is needed for functional analysis, additional rats will be included in the study, given that biomolecular analysis will employ the whole IVD.

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

B. The animals

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

Sprague Dawley rats are employed from a registered company (for example Harlan) on the basis that this strain is also used by other spine researcher and thereby results can be compared between studies. Rats develop degeneration by a simple puncture of the caudal IVD and the severity of the procedure is mild, in contrast to the procedure used in the dog model (Appendix no 1) where induction of IVD degeneration is considered moderate. In order to minimize animal suffering we have chosen to work with rats as a first approach of choosing the proper dose range to be studied.

Rats at the age of 12-14 weeks are being employed in the study so that they have reached skeletal maturity and the problems of IVD remodeling due to skeletal growth can be eliminated. We prefer to use ██████ rats, since ██████ rats are known to continue with growing at even later ages than ██████ rats and can hence influence IVD remodeling, can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up. Furthermore, in studies where we want to determine the fate of mesenchymal stem cells after intra-discal application, tracking of ██████ DNA can be done by means of qPCR on the ██████ gene. "Specific" ██████ genes are not available for this procedure and thereby only the combination of ██████ rat recipient and ██████ mesenchymal stem cell donor is feasible for these studies.

Gender is expected not to influence the study. No effects have been described of progesterone on regeneration of tissue by NP cells and only two studies

mention that estradiol can protect against induced cell death. As this is very limited and restricted to artificially induced cell death, and in human nor canine patients a connection between gender and disc degeneration was found, also at menopausal age, it is very unlikely that any effect of cycle will be evident.

Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to use 50 rats max for this purpose in the period of 2015-2020. In these number, are also 10 rats included to be used in pilot experiments, including 5 rats to set up the animal model in our facilities.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: These studies cannot be replaced with simple in vitro models or explant tissue cultures given that we need to translate the treatment strategies not only in a tissue-context but also a disease dependent-context where multiple signalling pathways are deranged. We address the challenges of this collaborative project by employing as a final step of translation the unique spontaneous diseased canine model, the use of cutting edge biomolecular techniques and strong implementation of the 3Rs. Within this project, the rat model with induced IVD degeneration serves as a preclinical model for translation towards the in vivo studies in large animal models (dog), while it serves also the veterinary patient.

The UU will develop the rat model of induced IVD degeneration as a preclinical/screening platform, before taking the step towards a large animal model like the dog (Replacement). In experimental rats randomized block design strengthen the power of the studies (Reduction) and longitudinal follow up of the animals is done by fluoroscopy. The rat model is on the overall less severe as experimental animal procedure compared to the dog animal model described under Appendix no 4 (both moderate severity but in rats 5 levels and in dog 8 levels). Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, and imaging are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI). Up to 5 caudal IVDs can be treated within in one experimental rat, indicating that up to 5 treatment groups can be included in a randomized block design study. The research group plans the experiment in an efficient way so that all IVDs are included in the study in order to minimize the number of animals. Post mortem analysis is performed by state-of-the-art and up an running techniques of histology, biomolecular, and biochemical analysis (Refinement).

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

Animals are allowed to accommodate to their new environment for at least 1 week, they are housed in groups, and only housed separately for one day post-induction of disc degeneration and post-treatment in order to prevent possible wound healing complications.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question 1.

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

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

☒ Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Occasionally wound healing may be delayed or wounds may become superficially infected; in that case the rat may have to be housed solitary for a short period of time.

Explain why these effects may emerge.

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

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

During the first pilot experiment, the effect of the IVD puncture will be assessed. If the 21G needle leaves substantial skin wounds, the rats will be housed individually for one day after the treatment.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

During the period before the animals are killed general clinical signs are observed. If clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized. Specific clinical signs related to the model may be extensive infection of the tail. The latter is considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

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

K. Classification of severity of procedures

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

mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

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

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

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

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

At the initiation of the in vivo study, all experimental dogs will undergo general clinical and orthopedic examination and will be subjected to MRI to determine the grade of IVD degeneration by means of Pfirrmann scoring. (Bergknut, Rutges et al. 2012) MRI will be performed with a 1.5 Tesla scanner using a Spine array coil (Philips Healthcare, Best, The Netherlands). Six weeks before the start of treatment, up to 5 lumbar IVDs per dog can undergo nucleotomy as

follows: under fluoroscopic guidance a needle will be inserted to center of the disc and the nucleus pulposus (NP) will be aspirated. Equal volumes of NP tissue will be removed from each IVD and confirmed by weighing the nucleotomized tissue on a micro-balance. To confirm that degenerated Pfirrmann grade 4-5 discs are indeed created by this procedure, an MRI will be performed at T=0 months, i.e. 6 weeks after induction of IVD degeneration.

In studies where mesenchymal stem cells (MSCs) are employed: MSCs originating from [REDACTED] beagle donors (readily available in the biobank of UU) will be expanded until Passage 2 in the laboratory. (Tryfonidou, Schumann et al. 2014) Prior to intradiscal transplantation, the MSCs will be analyzed with FACS for canine MSC markers, and their differentiation potential will be tested for three lineages (adipogenic, chondrogenic, and osteogenic) according to up and running protocols.

At T=0 (start of the treatment), the bioactive substance and/or BMSCs will be injected into the canine IVDs on the side contralateral to the annular puncture, if applicable. All injections will be done under fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection. At T=3 months, a second dose of the bioactive substance will be injected in the designated IVDs under fluoroscopic guidance. At T=6 months, the in vivo experiment will be terminated and dogs will be euthanized.

Read out parameters

In vivo:

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

- Pfirrmann grade of mid-sagittal slices of T2-weighted images (Bergknut, Rutges et al. 2012)
- Disc height index (DHI) will be calculated on T2W images for each IVD
- For analysis of quantitative MR images, values will be computed by calculating the mean signal intensity in each range of interest containing the nucleus pulposus.

Post-mortem:

- Radiography and computed tomography to evaluate the presence of extradiscal mineralization, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors and/or MSCs.
- Thereafter, the vertebral column (T12 – S1) will be harvested and further divided in spinal units (½ vertebra – endplate – IVD – endplate – ½ vertebra). Each unit will be transected sagittally into two identical parts. One part will be used for biochemical and biomolecular analyses of the NP and AF separately in order to determine transcriptional regulation by the treatment and the regenerative response in terms of matrix remodeling. The other part, after macroscopic evaluation (Thompson score), will be fixed, decalcified, and thereafter subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and immunohistochemical stainings).
- In experiments where the fate of BMSCs need to be determined, [REDACTED] dogs will be employed for the studies. The BMSCs that will be injected are of [REDACTED] origin and are not expected to cause graft versus host disease given that the IVD is a confined environment. Current clinical trials in humans are also conducted with allogeneic MSCs. The MSC fate at 6 months follow up will be determined by means of [REDACTED] on the presence of [REDACTED] DNA. Cell tracking of [REDACTED] DNA is achieved by up and running [REDACTED] for the presence of [REDACTED] genomic DNA for [REDACTED]. Specific [REDACTED] " genes for tracking of cell fate post mortem are not available. Hence, these studies can only be performed in this combination: [REDACTED] dog recipient, [REDACTED] dog MSC donor.

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

Dependent on the question and the treatment strategy investigated we will study the effect of the regenerative strategies in mild and severe IVD degeneration. Beagle dogs older than 1 year have in all IVDs mild degeneration. Severe degeneration of the IVD with evident loss of disc height is induced by puncture of the IVDs.

Clinical and orthopedic examination: is performed at 4 times during the study and more often if needed to determine the welfare status of the animals (mild procedure).

MRI is performed 4 times under general anesthesia and is considered a mild procedure. MRI is performed in order to detect degenerative changes and the regenerative response of the treated IVDs in a longitudinal manner.

Nucleotomy is done under general anesthesia and a minimal surgical approach in order to induce disc degeneration. This procedure is conducted once at the initiation of the study and the severity is considered moderate.

All strategies employed within this project rely on the employment of minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle, in which the bioactive substance alone, or loaded on a biomaterial that effectuates sustained release of the bioactive substance is injected once under general anesthesia. In specific objectives where the advantages of controlled release have not been shown yet, the treatment is repeated after 3 months. In studies of safety, duration of the treatment is limited to 3 months, while in studies where also efficacy is studied, the duration of the study is 6 months post injections. The severity of this procedure is considered mild.

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

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: disc height index. Based on a statistical power of 85%, an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.8% ($\alpha=0.008$, 6 comparisons), and assuming standard deviations as observed in previous studies: in the canine degenerative disc model in which variation of 15% was observed after MSC transplantation (Serigano, Sakai et al. 2010) and in the rabbit degenerative disc model variation of 15-20% was observed after injection of a bioactive substance with a significant biologic effect (Mwale, Masuda et al. 2011), four discs should be sufficient in each group to observe significant differences. In order to minimize the number of animals employed per study and to minimize the dog effect as random effect, we employ a block design of the study. Hence, in this specific example, four beagle dogs would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal quantitative MR imaging and post-mortem biomolecular, biochemical, and histological analysis. Given that we cannot exclude a drop out of one of the treatment groups where IVD degeneration is induced and the severity of disc degeneration has not achieved to be a Pfirrmann grade 4-5, we will include one extra dog in the study to ensure $n=4$ per treatment group.

All in vivo studies are approached in this manner and, dependent on the expected effect and the documented variation, we will select the appropriate number of animals.

B. The animals

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

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

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

laboratories dependent on the availability and the age.

Regarding the sex of animals: There is very limited evidence with regard to the role of gender in experimental dogs and its possible effects on IVD degeneration primarily because this has not been consistently studied in the literature. In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients (Smolders et al 2013), hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predilection also for the human population of patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011).

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

Specifically for studies where we want to track the fate of transplanted MSCs after a long term follow up, we need to work with [REDACTED] Beagle dogs that receive [REDACTED] MSCs during the transplantation procedure and thereby enables tracking [REDACTED] MSCs by means of the [REDACTED]

Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to use 25 dogs in the period of 2015-2020

References:

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: These studies cannot be replaced with simple in vitro models or explant tissue cultures given that we need to translate the treatment strategies

not only in a tissue-context but also a disease dependent-context where multiple signalling pathways are deranged. Therefore, we address the challenges of this collaborative project by employing the unique spontaneous diseased canine model, the use of cutting edge biomolecular techniques and strong implementation of the 3Rs. In this respect, the dog serves as a preclinical model for translation towards the "first in man" studies, while it serves also the veterinary patient. The Utrecht referral animal university clinic frequently encounters canine patients with back pain and neurologic deficits due to IVD disease. The canine species is considered to be a suitable model to study the process of IVD degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans. (Bergknut, Rutges et al. 2012).

The UU has developed a preclinical platform employing the Beagle dog as an experimental animal and veterinary patients with chronic low back pain (Figure in Appendix). In experimental animals randomized block design strengthen the power of the studies (Reduction) and longitudinal follow up of the animals is done by modern imaging techniques (1.5T Magnetic Resonance Imaging and 64-slice Computer Tomography) and objective gait analysis (force plate). Supervision of surgeries and postoperative care, anesthesia, postoperative analgesia, imaging and force plate analysis are performed by European board-certified veterinary specialists in surgery (ECVS), neurology (ECVN), anesthesia (ECVA), and diagnostic imaging (ECVDI). For the laboratory dogs, post mortem analysis is performed by histology, biomolecular, and biochemical analysis from each IVD of the lumbar spine (Refinement).

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question 1.

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

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

☒ Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints

K. Classification of severity of procedures

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

moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

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

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

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

☒ Yes

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.813.023
2. Titel van het project : Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration
3. Titel van de NTS : Nieuwe behandelingen voor chronische rugpijn

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ☒ ontvangen door DEC: 26-06-2015
☐ aanvraag compleet:
☒ in vergadering besproken: 13-07-2016 en 26-08-2015
☒ anderszins behandeld: per email 10-09-2015
☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 16-07-2015 tot 12-08-2015 en
03-09-2015 tot 09-09-2015 en
30-09-2015 tot 01-10-2015
☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
☐ aanpassing aanvraag:
☒ advies aan CCD: 12-10-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 26-08-2015
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: Aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen:
De hond is doeldier met mogelijke translatie naar de mens. Alleen het lijkt wel alsof er nu al geld is voor het humane onderzoek en dat het onderzoek van de hond later pas gefinancierd gaat worden als het onderzoek bij de mens succesvol is. Moet het onderzoek dan niet herschreven worden naar de mens?
- Strekking van het (de) antwoord(en):
Weergave presentatie onderzoeker:

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

Het klopt dat bedrijven in eerste instantie alleen geïnteresseerd zijn in de patiëntenkliniek, als dat werkt dan is de farmacie ook geïnteresseerd in de hond. Maar het onderzoek is voor honden en mensen bedoeld want zij hebben beiden last van rugklachten. Ter indicatie 70/85 procent van de mensen krijgt rugklachten en het is nummer 1 van klachten in het dagelijks leven. Veel honden hebben ook last van rugklachten en 1 op de 3 honden die een hernia ontwikkelt overlijdt daar aan. Honden die zwaar werk leveren zoals politiehonden en hulphonden hebben 50 procent meer kans om rugklachten te ontwikkelen. Het is maatschappelijk voor de mens en de hond een zeer belangrijk onderwerp. Daarnaast is de hond ook een goed model voor de mens omdat hij niet alleen klinisch dezelfde klachten laat zien, maar ook biochemisch, biomoleculair, radiologisch en fysiologisch. Het model is afgelopen jaren geheel in kaart gebracht en gevalideerd met de hond en daarbij komt dus dat de hond ook doeldier is.

De strategie waar het om draait zijn de stamcellen. Vanwege degeneratie moeten er meer cellen komen tussen de wervels die gedegenerereerd zijn. Er wordt gewerkt met stamcelinjecties, zo kan er in een vroeg stadium behandeld worden waardoor een operatie hopelijk voorkomen kan worden.

Waarom worden honden gebruikt? Met name voor het onderzoek naar nieuwe behandelingsmethoden hetgeen goed mogelijk is in de hond. Bij honden met korte poten is al heel vroeg discus degeneratie aanwezig. Op de leeftijd van drie jaar vertonen deze dieren al klinische klachten. Bij honden met lange poten is discus degeneratie pas op latere leeftijd waarneembaar. Ze vertonen vooral klachten in de lage rug en de nek, hetgeen ook bij de mens het geval is.

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 16-07-2015, 03-09-2015 en 30-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: De DEC vraagt zich af of dit project zich met name richt op de hond als doeldier of dat het onderzoek met name voor de mens bedoeld is. Graag toelichten. Mocht u zich met name op de mens richten, dan verzoekt de DEC u toe te lichten waarom u in dit onderzoek specifiek voor de hond hebt gekozen en niet voor konijn, rat of muis. De DEC verzoekt u dit ook op te nemen in de NTS.
- 3.1, achtergrond: De DEC mist informatie over de stand van zaken op dit gebied wereldwijd, resultaten van uw eigen voorgaande onderzoek en een korte weergave van

relevante literatuur (niet verwerkt in een bijlage). Graag toelichten en benoemen of u een systematic review hebt uitgevoerd.

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u de informatie over caveolin-1 op te nemen in de achtergrond.
- 3.2 doel: U heeft het bij punt 1 over een 'three-stage approach', maar u noemt er uiteindelijk maar twee. Graag verhelderen.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u dit stuk in te korten, waarbij u let op de leesbaarheid en niet teveel herhaalt. De DEC verzoekt u de hoofddoelen uiteen te zetten per punt en u te beperken tot het overall design. Graag herschrijven.
- 3.4, onderzoeksstrategie: Bij 3.4.4 klopt de nummering van de type dierproeven niet. Graag wijzigen.

Bijlagen:

- De volgorde van de bijlagen wekt verwarring, want bijlage 4 wordt voor bijlage 3 uitgevoerd. Graag wijzigen.

- Datum: 03-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel:

- De DEC adviseert om kort aandacht te besteden aan wat precies validatie in vitro inhoudt en hoe nieuwe targets worden geïdentificeerd. Voorts adviseert de DEC het gebruik van honden nader aan te scherpen en te motiveren, met name met betrekking tot het zoeken van nieuwe behandelingsmethoden voor lage rugpijn.

- Datum: 30-09-2015

- Strekking van de vraag / vragen:

- In bijlage 3 vraagt u vrouwelijke ratten aan, maar de motivatie daarvoor is onvoldoende. Graag nader motiveren.
- In bijlage 4 het gebruik van vrouwelijke of mannelijke honden graag nader motiveren.

- Datum antwoord: 12-08-2015

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

Projectvoorstel:

- Dit project richt zich op de hond en de mens aangezien beiden last kunnen hebben van discusdegeneratie en inherent rugpijn (zoals ook in de NTS beschreven staat). Modellen zoals de rat, konijn of muis hebben een translatiestap nodig voordat resultaten naar de hond en mens vertaald kunnen worden. Aangezien de hond een doel dier is, is gekozen om met de hond te werken als experimenteel dier voor de laatste translatiestap naar de honden/humane patiënt.
- In de aangepaste versie van de aanvraag is er aanvullende informatie opgenomen in de achtergrondsectie. [REDACTED] een systematische review uitgevoerd specifiek voor de hond (Bach FC, Willems N, Penning LC, Ito K, Meij BP, Tryfonidou MA (2014)

Potential regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration in dogs. BMC Vet Res 10: 3-6148-10-3.) en voor de mens in samenwerking met internationale partners actief op het gebied van regeneratieve behandelingen van tussenwervelschijf regeneratie [REDACTED]

(2014) A systematic review of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells for disc degeneration: insights and future directions for regenerative therapeutics. Stem Cells Dev 23: 2553-2567.) Een volledige weergave van de literatuur is opgenomen in de appendix.

- De aanvullende informatie over caveolin-1 is toegevoegd aan de achtergrond. Tevens is aanvullende achtergrondinformatie betreffende andere actieve stoffen (zoals Link-N) en stamcellen nu opgenomen in het voorstel. Hiermee wordt de strategiesectie korter en bondiger, zoals de DEC commissie voorstelt.
- Stap 3 wordt nu toegelicht in de aangepaste versie. In de derde stap wordt een vertaling gemaakt naar primaire cellen geïsoleerd uit degenererende tussenwervelschijven van beide species (hond en mens).
- Dit is aangepast in het onderzoeksvoorstel zoals voorgesteld. Gedetailleerde onderbouwing betreffende het dier en model worden verder behandeld in de aangewezen dierprocedures.

Bijlagen:

- Dit is aangepast in het onderzoeksvoorstel.

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

Projectvoorstel:

- *De DEC adviseert om kort aandacht te besteden aan wat precies validatie in vitro inhoudt en hoe nieuwe targets worden geïdentificeerd.*

The in vitro validation and target identification has been revised in order to address this as follows in section 3.4.2 under Key objective 1: "Approach: A three-stage approach will be set up in order to narrow down the targets derived from "-omics" studies, with focus on matrix production and inflammation control, and reduce the number of animals employed. The first stage is animal-free and employs an established cartilage cell line, the ATDC5. [REDACTED] ATDC5 are retrovirally transduced with a vector encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) driven by the human collagen type 2 promoter to monitor chondrogenesis. Given eicosanoids formed via the cyclooxygenase (COX) pathways are major players in various inflammatory and degenerative disorders, COX-2 activity will be determined by a colorimetric method after initial stimulation by a range of TNF · /IL1 concentrations. A subset of the targets will be studied in the second stage in primary chondrocytes isolated from transgenic mice harboring a fluorescent reporter based on collagen 2. [REDACTED] These mice enable isolation of a pure population of proliferating chondrocytes. In this in vitro model

chondrogenesis and inflammation control will be studied in micro-aggregates in the presence of the selected library of peptides and/or miRNAs based on the observed biologic effects in stage 1. The most promising targets will be functionally studied/validated in the third animal-free stage over a longer period of time in a 3D-culture. Herein primary human and canine CLCs isolated from degenerated discs readily available through the Biobank will be used, as a last translational step towards the follow up in vivo studies. Transcription factor-miRNA-target gene networks associated with IVD health will help determine miRNA master regulators that will be validated by mechanistic miRNA studies."

- *Voorts adviseert de DEC het gebruik van honden nader aan te scherpen en te motiveren, met name met betrekking tot het zoeken van nieuwe behandelingsmethoden voor lage rugpijn.*

The social relevance of this project addresses both the human and veterinary aspect. In order to improve this further the point raised by the DEC has been addressed by including additional information on the clinical impact of IVD disease in both canine and human patients which is now included in the Background section as follows:

"The project focuses on developing treatment strategies for neck and back pain of canine and human patients in close collaboration with academia from the medical and bioengineering field.

Low back pain in humans has been identified as one out of seven high-burden conditions by the 2013 Report Priority Medicines for Europe and the World. (Kaplan et al., 2013) It is the most common type of pain restricting daily activity in EU citizens (Eurobarometer, 2007) and entails the largest number of years lived with disability. (Hoy et al., 2014) Neck and back pain are strongly related to intervertebral disc (IVD) degeneration (Cheung et al., 2009). Like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration with similar characteristics and clinical signs (Meij and Bergknut, 2010a). Owners of dogs may report unilateral or bilateral lameness or paresis/paralysis, toe dragging, low tail or neck carriage, difficulties with rising, sitting or lying down, reluctance to jump or climb, urinary or faecal incontinence, and hyperesthesia or self-mutilation [REDACTED] In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs [REDACTED] Given that, not only on a clinical levels, but also on a histological, biochemical, and radiological level IVD degeneration in canines is similar to human, the dog is considered to be a suitable animal model for human IVD degeneration [REDACTED] As such, this project employs experimental dogs as a last step to translate new treatment strategies towards canine and human patients with IVD disease."

Furthermore, in the Appendix-description animal procedure no 4, the justification of the choice to use the dog as an animal model now also addresses the clinical relevance of IVD disease in the canine population. This project will study new treatment strategies for both the canine and human patients with IVD disease. This is done as follows: "The canine species is considered to be a suitable model to study the process of IVD

degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans. () Owners of dogs with IVD disease may report unilateral or bilateral lameness or paresis/paralysis, toe dragging, low tail or neck carriage, difficulties with rising, sitting or lying down, reluctance to jump or climb, urinary or faecal incontinence, and hyperesthesia or self-mutilation () In veterinary medicine IVD disease is a relatively common reason for euthanasia in dogs () As such, the experimental animal model used in this animal procedure serves as a last step to translate new treatment strategies towards canine and human patients with IVD disease."

The "niet-technische samenvatting" has been adjusted accordingly.

- Datum antwoord: 01-10-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

In bijlage 3 is in overleg met de IvD de onderbouwing voor het gebruik van vrouwelijke dieren verder toegelicht als volgt:

Rats at the age of 12-14 weeks are being employed in the study so that they have reached skeletal maturity and the problems of IVD remodeling due to skeletal growth can be eliminated. We prefer to use () rats, since () rats are known to continue with growing at even later ages than () rats and can hence influence IVD remodeling, can increase in size and gain a lot of weight during the longer term experiments with 6 months follow up. Furthermore, in studies where we want to determine the fate of mesenchymal stem cells after intra-discal application, tracking of () DNA can be done by means of () on the () () "Specific" () genes are not available for this procedure and thereby only the combination of () rat recipient and () mesenchymal stem cell donor is feasible for these studies. Gender is expected not to influence the study. No effects have been described of progesterone on regeneration of tissue by NP cells and only two studies mention that estradiol can protect against induced cell death. As this is very limited and restricted to artificially induced cell death, and in human nor canine patients a connection between gender and disc degeneration was found, also at menopausal age, it is very unlikely that any effect of cycle will be evident.

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

Regarding the sex of animals: There is very limited evidence with regard to the role of gender in experimental dogs and its possible effects on IVD degeneration primarily because this has not been consistently studied in the literature. In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients () hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predilection also for the human population of

patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011). In short term studies (range of 3 months) we aim at having a sex ratio of 1:1 in the study cohort in order to have both sexes represented in the study. In long term studies of > 6 months, we preferably work with [REDACTED] dogs in order not to have issues with the cyclus of [REDACTED] dogs. [REDACTED] dogs have twice a year an oestrus cycle and when not used for breeding castration is advised in order to diminish the risk for development of breast cancer and other complications of irregularities of the cycle, including pseudopregnancy and pyometras, and accidental fertilisation cannot be excluded during long term housing of the animals. For this reason, [REDACTED] dogs when not used for breeding should be sterilised, which would add another experimental procedure with moderate severity. Specifically for studies where we want to track the fate of transplanted MSCs after a long term follow up, we need to work with [REDACTED] Beagle dogs that receive [REDACTED] MSCs during the transplantation procedure and thereby enables tracking [REDACTED] MSCs by means of the [REDACTED]

References:

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

- [REDACTED]
[REDACTED]

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

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.

- ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
☐ wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmethoden voor discus degeneratie (IVD) bij mens en hond. Het onderzoek naar nieuwe middelen steunt op fundamenteel onderzoek naar de biochemische factoren in de normale ontwikkeling van de discus (zie bijvoorbeeld het onderzoek naar de rol van caveolin-1). De behandeling van patiënten met chronische rugpijn bestaat in eerste instantie uit het slikken van pijnstillers. Wanneer deze niet meer werken is de enige optie nog een operatie, waarbij de discus wordt vervangen of weggehaald, en waardoor de wervels aan elkaar groeien. Deze operaties gaan gepaard met een lange herstelperiode en in veel gevallen herstelt de patiënt niet volledig. Beter zou het zijn om een operatie te voorkomen en slijtage van de rug in een vroeg stadium te behandelen. Door middel van deze deels fundamentele en deels translationele studie kan men op zoek gaan naar nieuwe factoren die een belangrijke rol spelen in de slijtage en het herstel van de versleten discus en dit vervolgens vertalen naar mogelijke behandelingen bij ratten en honden (experimentele dieren) voordat ze kunnen worden toegepast bij de patiënt (mens en hond).
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Huisvesting en verzorging
 - ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
- De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief in de bijlagen als gevolg van de (be)handelingen in de bijlage varieert van licht tot

matig ongerief. In bijlagen 1 en 2 is het ongerief licht vanwege het euthanaseren van de dieren. In bijlage 3 is het ongerief eveneens ingeschat als licht als gevolg van het induceren van IVD in de staart onder narcose, het onder anesthesie toedienen van biomaterialen of MSC's en het euthanaseren van de dieren. In bijlage 4 is het cumulatieve ongerief matig als gevolg van het induceren van degeneratie van de tussenwervelschijf onder narcose, het meerdere malen onder narcose onderzoeken van de dieren en het maken van MRI's, het uitvoeren van een nucleotomy onder narcose, het onder anesthesie toedienen van biomaterialen of MSC's en het euthanaseren van de dieren. De DEC is van mening dat deze ongeriefinschattingen realistisch zijn.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In het fundamentele deel (bijlagen 1 en 2) van dit project wordt onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van de discus en de rol van specifieke eiwitten. Hiervoor worden in bijlage 1 cellijnen opgezet, maar hiervoor is materiaal afkomstig van muizen nodig. In bijlage 2 wordt de rol van caveolin-1 in IVD fysiologie en IVD degeneratie onderzocht en omdat Caveolin-1 een weefsel- en context-afhankelijke effect heeft, kunnen in vivo studies met deze muizen niet worden vervangen door in vitro experimenten. De translationele studies in bijlagen 3 en 4 kunnen niet worden vervangen door in vitro modellen of weefselkweken aangezien hier de behandelingsstrategieën getest worden in ziektemodellen waarbij meerdere signaalroutes/biochemische cascades zijn aangetast. Ten behoeve van de translatie is het bovendien vereist dat deze nieuwe behandeling getest wordt op proefdieren, eerst in kleine proefdieren, daarna op grote proefdieren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. In het fundamentele onderzoek wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van surplus dieren uit ander onderzoek en worden verfijnde laboratoriumtechnieken toegepast, waarmee per dier meer kennis verkregen kan worden. Voor wat betreft de dieren die benodigd zijn in bijlage 2 wordt samengewerkt met een andere onderzoeksgroep die dezelfde muizenstam gebruikt voor onderzoek naar lever lipidose en regeneratie. Daarnaast worden, indien mogelijk, meerdere discussen per dier gebruikt i.p.v. slechts één discus, waardoor er minder dieren nodig zijn. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren zijn, in bijlagen 3 en 4, statistische methoden toegepast en wordt gebruik gemaakt van een randomized block design. In bijlage 3 kunnen maximaal 5 staart IVD's behandeld worden in één experimentele rat, wat inhoudt dat tot 5 behandelingsgroepen kunnen worden geïncorporeerd in een randomized block design. In bijlage 3 zullen vrouwelijke ratten gebruikt worden omdat mannelijke ratten ook na de leeftijd van 12-14 weken nog door groeien, wat van invloed is op de IVD 'remodelling'. Daarnaast is in de experimenten waarbij MSC's worden toegediend DNA van dieren van het andere geslacht nodig zodat het DNA gevolgd kan worden. Aangezien er geen DNA van vrouwelijke ratten beschikbaar is, zal DNA van mannelijke ratten gebruikt worden en zijn dus vrouwelijke ratten noodzakelijk. In bijlage 4 zullen voor de korte termijn studies (<3 maanden) vrouwelijke en mannelijke honden gebruikt worden. Voor de lange termijn studies (>6

maanden) worden mannelijke honden gebruikt vanwege de cyclus van vrouwelijke honden. Daarnaast wordt geadviseerd om vrouwelijke honden te steriliseren om de kans op borstkanker en andere onregelmatigheden van de cyclus te verkleinen, wat een extra experimentele handeling met matig ongerief betekend. Om in bijlage 4 het aantal benodigde dieren te verminderen zal ook gekeken worden of het mogelijk is IVD in de staart van de hond te induceren. Hierdoor wordt het aantal experimentele condities of duplicaten per dier verhoogd en zullen minder dieren nodig zijn. Nadeel hiervan is wel dat de omvang van de IVD kleiner is waardoor niet alle biochemische, histologische en biomoleculaire parameters bepaald kunnen worden. Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er zullen adequate humane eindpunten worden toegepast en vanwege de aard van de experimenten zal in bijlagen 3 en 4 ook adequate pijnbestrijding worden toegepast. Indien in bijlage 4 bij de honden ook IVD in de staart wordt geïnduceerd, zal dat leiden tot verfijning, aangezien IVD in de staart een minimaal invasieve techniek is. De ratio voor het gebruik van muizen in bijlagen 1 en 2 is gelegen in het voorbereidende (bijlage 1) en fundamentele (bijlage 2) onderzoek naar de bijvoorbeeld de rol van caveolin-1. Omdat met ratten veel ervaring is in onderzoek naar discus degeneratie zullen deze in bijlage 3 worden gebruikt om de nieuwe behandelingen voor discus degeneratie verder te testen. In bijlage 4 zullen honden gebruikt worden voor het verdere onderzoek naar discus degeneratie. Ook met honden is veel ervaring in onderzoek naar discus degeneratie. Daarnaast dient de hond als 'doeldier' omdat discus degeneratie ook bij honden optreedt en deze vorm van slijtage vergelijkbaar is met de slijtage zoals die bij mensen voorkomt.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmethoden voor discus degeneratie bij mens en hond, substantieel is.

Ten gevolge van de inductie van IVD in de rug en de staart treedt bij een aanzienlijk deel van de dieren licht tot matig ongerief op, maar de DEC is van mening dat voor de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de verschillende (be)handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel.

Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is nog niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren, en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar.

De onderzoekers hebben goed beargumenteerd waarom zij in dit onderzoek alleen vrouwelijke ratten en vrouwelijke dan wel mannelijke honden willen gebruiken. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het ten hoogste matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002015285

Bijlagen

2

Datum 20 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

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

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015285. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht.

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag

☐ Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:

1 september 2015

Geplande einddatum:

30 augustus 2020

Titel project:

Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration

Titel niet-technische samenvatting:

Regeneratieve behandelingen voor chronische rugpijn

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.n

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 741,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

☒ Projectvoorstel

☒ Beschrijving Dierproeven

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

☒ DEC-advies

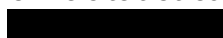
Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Ut
Datum: 19 oktober 2015



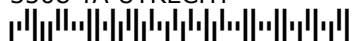
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015285

Bijlagen

2

Datum 20 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 oktober 2015

Vervaldatum: 19 november 2015

Factuurnummer: 15700285

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015285	€ 741,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT
3501AA12007

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015285

Uw referentie

Bijlagen

Datum 20-11-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Datum
20-11-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015285

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager			
Postcode		Huisnummer	

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer	
----------------	--

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

☐	
☐	
☐	

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam		
Datum	-	- 20
Handtekening		



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT
3501AA12007

Centrale Commissie
Dierproeven

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015285

Uw referentie

Bijlagen

Datum 20-11-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Datum
20-11-2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015285

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Utrecht, 23 november 2015

Geachte leden van de Centrale Commissie voor Dierproeven,

Op 23 november 2015 hebben wij uw response op een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. In uw brief bleek nadere toelichting nodig te zijn op enkele inhoudelijke onduidelijkheden. In de bijlage treft u puntsgewijs de toelichting op de vragen die de CCD gesteld heeft. Hierin worden ook de bijbehorende wijzigingen in de formulieren aangegeven met rode tekst. Tevens zijn de gewijzigde documenten van de aanvraag bijgesloten.

We hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en dat u tot een positief advies kunt komen over dit project.

Vriendelijke groeten,



Puntsgewijs response op vragen van de CCD tav AVD 108002015285

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humane eindpunten te verwachten zijn.

De ontbrekende informatie is nu ingevuld in de bijgewerkte documenten.

Proef 1: 0%

Proef 2: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease. Mice employed for breeding are used for the period of max 24 weeks of age, in this time frame the likely incidence for a humane endpoint is 5%.

Proef 3: literature does not report specific complications to this animal model and contact with researchers employing the model did not indicate that this is likely to happen. The likely incidence is estimated at 2%.

Proef 4: We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. The likely incidence is estimated at 2%.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Het betreft een established muizen zijn (GG2939) die sinds 2008 onderhouden wordt. Fokken brengt geen ongerief met zich mee.

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humane eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Inderdaad dieren overlijden plotseling en voorafgaand worden geen klinische verschijnselen waargenomen (dit wordt benoemt in het aanvraag als volgt: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.) De klinische problematiek speelt zich met name in de periode na de 27 weken leeftijd. Echter, de fokdieren worden maximaal tot de leeftijd van 6 maanden ingezet en fokken brengt geen ongerief met zich mee, voor zo wel de caveolin-1 KO muizen (GG2642) en de WT-muizen op het zelfde genetische achtergrond (lijn 100903). Zowel het GDL als de IvD kunnen dit bevestigen. Beide lijnen worden al jaren onderhouden bij de SPG afdeling van het GDL te Utrecht.

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

Inderdaad bij proef 3 en 4 zijn experimenten gepland waarbij we het (additive) effect van stamcellen willen onderzoeken en willen weten wat de rol van de stamcellen is in de behandeling van discusslijtage. Door mannelijke stam cellen te gebruiken kunnen we (zonder verdere modificaties die mogelijk invloed hebben op het gedrag van de cellen) de cellen traceren na afloop van het experiment.

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

We denken dat er sprake is van een misverstand. De aanvraag is ondertekend door de portefeuillehouder van de UU, prof.dr. A. Pijpers. Dit is de juiste persoon. Inmiddels is hierover telefonisch contact opgenomen met het ondersteunend bureau. Tijdens dat contact kon door de secretaresse worden bevestigd dat de ondertekening juist was. Derhalve is er niet een nieuw ondertekend aanvraag toegevoegd bij de beantwoording van deze vragen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

De leges bleken inderdaad niet betaald. De reden hiervoor is dat de factuur, anders dan de factuur voor projectaanvraag 108002015282 (afkomstig van dezelfde onderzoekster en tegelijkertijd ingediend), niet naar het juiste adres was verstuurd. Daardoor was de factuur niet bij de financiële afdeling terecht gekomen. Ook hierover is inmiddels telefonisch contact geweest met de CCD. Er is op 24 november jl. een nieuwe factuur verstuurd. De betaling wordt zo snel mogelijk uitgevoerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015285
Bijlagen

1

17 DEC. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Prof. dr. Pijpers,

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 30 augustus 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

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

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op artikel 10 a1 van de Wod worden twee algemene voorwaarden toegevoegd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

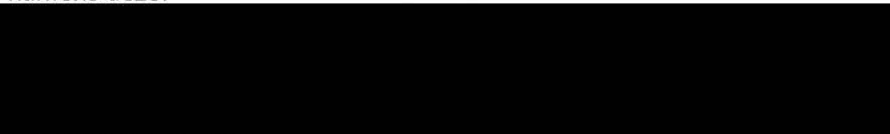
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Universiteit Utrecht
Adres:	Postbus 12007
Postcode en plaats:	3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer:	10800

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 30 augustus 2020, voor het project

"Regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration" met aanvraagnummer AVD108002015285, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De startdatum wijkt af van de aangevraagde datum omdat deze in het verleden ligt. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is UD1.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 oktober 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 oktober 2015, ontvangen op 19 oktober 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Isolation of primary pd2EGFP+ chondrocytes from Col2-pd2EGFP reporter mice	Muizen (Mus musculus) / Col2-pd2EGFP mice, GG2939 situated and maintained at the GDL, Utrech	80	Licht / mild	transgene muizen
2: Studying the IVD phenotype of Caveolin-1 KO mice	Muizen (Mus musculus) / Caveolin-1 KO en WT muizen	230	Licht / mild	transgene muizen
3: Rat model with induced IVD degeneration	Ratten (Rattus norvegicus) / Sprague Dawley rats	50	Licht / mild	nvt
4: Canine model of IVD degeneration (mild and severe degeneration)	Honden (Canis familiaris) / beagle	25	Matig / moderate	nvt

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Levensloopdossier

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

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 17 december 2015 16:17
Aan: 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'
Onderwerp: uitslag AVD2015285

Geachte DEC Utrecht,

Wij hebben vandaag een beschikking verstuurd voor aanvraag AVD2015285. Met jullie referentienummer

2015.II.813.023. De aanvraag is in zijn geheel vergund zoals aangevraagd.

Er zijn een aantal vragen gesteld en beantwoord.

Deze zijn hieronder weergegeven.

In de vier dierproeven geeft u niet duidelijk aan welke incidentie (in % van het gebruikte aantal dieren) hoe groot het aantal dieren is dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. In de vraag daarvoor geeft u wel aan dat humaan eindpunten te verwachten zijn.

De ontbrekende informatie is nu ingevuld in de bijgewerkte documenten.

Proef 1: 0%

Proef 2: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease. Mice employed for breeding are used for the period of max 24 weeks of age, in this time frame the likely incidence for a humane endpoint is 5%.

Proef 3: literature does not report specific complications to this animal model and contact with researchers employing the model did not indicate that this is likely to happen. The likely incidence is estimated at 2%.

Proef 4: We already have performed similar experiments in the past with at least n=30 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints. The likely incidence is estimated at 2%.

Bij proef 1 gebruikt u transgene muizen. Gaat het om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt?

Het betreft een established muizen zijn (GG2939) die sinds 2008 onderhouden wordt. Fokken brengt geen ongerief met zich mee.

Bij proef 2 geeft u aan dat de gebruikte knock-out muizen hart en vaatproblemen ontwikkelen. Een percentage van de gebruikte dieren komt plotseling te overlijden. Is onze interpretatie correct dat dit komt door plotseling optredende oorzaken als hartfalen, en dat het daardoor niet mogelijk is om humaan eindpunten te voorzien? Kunt u meer uitleg geven over de ongerief en gezondheidsproblemen die deze dieren hebben als gevolg van de Calveoline-1 knockout?

Het doet vermoeden dat het een foklijn is met ongerief. Daarom ook voor deze proef de vraag of het gaat om een established line waarvan is vastgesteld dat het houden of fokken geen ongerief voor de dieren met zich meebrengt? Indien dit niet het geval is, dient het fokken en houden onder een vergunning gebracht te worden.

Inderdaad dieren overlijden plotseling en voorafgaand worden geen klinische verschijnselen waargenomen (dit wordt benoemt in het aanvraag als volgt: Caveolin-1 KO mice show 50% reduction in life span, with viability declining between 27 and 65 weeks of age. Mice that die within this time frame, die suddenly, without any visible signs of disease.) De klinische problematiek speelt zich met name in de periode na de 27 weken leeftijd. Echter, de fokdieren worden maximaal tot de leeftijd van 6 maanden ingezet en fokken brengt geen ongerief met zich mee, voor zo wel de caveolin-1 KO muizen (GG2642) en de WT-muizen op het zelfde genetische achtergrond (lijn 100903). Zowel het GDL als de IVD kunnen dit bevestigen. Beide lijnen worden al jaren onderhouden bij de SPG afdeling van het GDL te Utrecht.

Proef 4: U geeft diverse redenen op om alleen met vrouwelijke dieren te werken. Gaat het in ieder geval in alle proefdieren in proef 3 en 4 om het volgen van mannelijk DNA in de dieren?

Inderdaad bij proef 3 en 4 zijn experimenten gepland waarbij we het (additive) effect van stamcellen willen onderzoeken en willen weten wat de rol van de stamcellen is in de behandeling van discusslijtage. Door mannelijke stam cellen te gebruiken kunnen we (zonder verdere modificaties die mogelijk invloed hebben op het gedrag van de cellen) de cellen traceren na afloop van het experiment.

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

We denken dat er sprake is van een misverstand. De aanvraag is ondertekend door de portefeuillehouder van de UU, prof.dr. A. Pijpers. Dit is de juiste persoon. Inmiddels is hierover telefonisch contact opgenomen met het ondersteunend bureau. Tijdens dat contact kon door de secretaresse worden bevestigd dat de ondertekening juist was. Derhalve is er niet een nieuw ondertekend aanvraag toegevoegd bij de beantwoording van deze vragen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

De leges bleken inderdaad niet betaald. De reden hiervoor is dat de factuur, anders dan de factuur voor projectaanvraag 108002015282 (afkomstig van dezelfde onderzoekster en tegelijkertijd ingediend), niet naar het juiste adres was verstuurd. Daardoor was de factuur niet bij de financiële afdeling terecht gekomen. Ook hierover is inmiddels telefonisch contact geweest met de CCD. Er is op 24 november jl. een nieuwe factuur verstuurd. De betaling wordt zo snel mogelijk uitgevoerd.

Met vriendelijke groet,

■■■■■■■■■■