

	Inventaris Wob-verzoek W16-07S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015339								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Communicatie aanvrager voorgenomen besluit				x		x	x	
10	Vragen antwoorden DEC				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	
13	Mail terugkoppeling DEC 20-1-2016				x		x	x	



04 DEC. 2015

AVD 105002015339

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

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Rijks Universiteit Groningen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	01179037
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]
Postbus	
Postcode en plaats	9713 AV Groningen
IBAN	NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(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.

(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 | 1 - 1 - 2016 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Cellular senescence in aging and cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Cellulaire veroudering tijdens algemene veroudering en bij kanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, 9713 AV GRONINGEN |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☐ Melding Machtiging
- ☒

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 03 - 12 - 2015

Handtekening 



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Rijks Universiteit Groningen
- 1.3 Provide the title of the project. Cellular senescence in aging and cancer

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Cellular senescence is a potent and critically important anti-cancer mechanism that causes cells to irreversibly lose the ability to divide. Despite this beneficial aspect of cellular senescence, the accumulation of senescent cells in mammals has long been hypothesized to explain in part why we age. This 'trade-off' between beneficial and deleterious effects of an anti-cancer mechanism is consistent

with a major classical evolutionary theory of aging.

The transformation of a dividing cell into a senescent cell can occur via different mechanisms, including stresses that damage DNA, such as telomere shortening, UV radiation and chemotherapy. Why might senescent cells promote aging in organisms such as mice and humans? Senescent cells have several potentially harmful characteristics, including the secretion of pro-inflammatory proteins and other factors that can disrupt tissue, leading to cancer progression or loss of function of various tissues. On the other hand, a transient accumulation of senescent cells during tissue repair has been demonstrated to be potentially important to limit the fibrosis after damage.

There is a great deal of cell culture data that support the idea that senescent cells are important contributors to aging and that certain immune cells can help clear or eliminate senescent cells.



Using this animal model, we have been able in the past 5 years to demonstrate the following:

- Senescent cells are accumulated with age. A significant induction of senescence is detectable starting from 16 months of age and the number of senescent cells increase with time;
- Senescent cells are induced by ionizing radiation and chemotherapy, 2 different standard anti-cancer and DNA damaging insults, and can persist in tissues for long (> 3 months);
- Therapy-induced senescent cells contributes to several side effects associated with the anti-cancer treatment, such as fatigue, strength and metabolism;
- Therapy-induced senescent cells promotes cancer relapse and cancer metastasis;
- During skin wound healing, senescent cells are transiently induced and are able to promote optimal cutaneous wound healing.

Now, we aim to further understand the complex roles of senescent cells in vivo, both beneficial and detrimental, and to study how different stimuli can promote senescent cells with different phenotypes. The short-term goal of the outlined projects is to isolate the cellular and molecular mechanisms by which senescent cells can promote aging, age-related pathologies, including cancer, and side effects of chemotherapy, from the beneficial role during tissue repair.

The long-term goal of the lab is to target senescent cells and their secretory phenotype and to generate new interventions aimed at delaying or preventing aging.

The future plan includes testing different hypothesis, which derive from preliminary data we have obtained either in vivo or in cell culture, using the skin as the reference tissue. We think that using the skin to test our hypothesis is supported by the following:

- There is a dual and opposite role of transient (wound healing) vs persistent senescent cells (cancer promotion – melanoma);
- Senescent cells accumulate in the skin with age and with chemotherapy;
- Aging of the skin is promoted by either intrinsic (chronological) or extrinsic factors (UV radiation), which well mimics human aging;
- Aging of the skin shares several basic principles with other disease involving connective tissue (osteoarthritis, atherosclerosis), making our discoveries highly adaptable to other systems;
- Age-associated disorders of the skin are easy to monitor and poorly invasive;
- Skin cancer incidence exponentially increases with age and it's the most common of all cancers. Moreover, the survival rate for patients with late stage metastatic melanoma is only 15-20% over a 5 years period;
- Current therapies rely on drugs (chemotherapy) with several side effects; including nausea, fatigue, and decline in muscle mass.

Our goal is to perform experiments to study the physiology and pathology of the skin in regards of the senescent cells phenotype. Moreover, we aim to better characterize the role of senescent cells in promoting side effects of chemotherapy, since treatment with cytotoxic drugs is limited by toxicity and off-target effects. Being able to identify new potential molecular targets based on the signature of

senescent cells will not only candidate senescent cells for new combinatorial therapies, but will have a big impact on the well-being of the patients going through anti-aging or anti-cancer interventions.

In summary, the hypothesis we have generated are the following:

- First, senescent cells that chronically accumulate in an organism after aging or external DNA damaging insults promote age-related phenotypes in the skin and other tissues;
- Second, senescent cells that chronically accumulate in an organism after aging or external DNA damaging insults promote cancer and contribute to adverse reactions of anti-cancer therapies

3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project is to understand the complex roles of senescent cells in vivo, both beneficial and detrimental, and to study how different stimuli can promote senescent cells with different phenotypes, with particular focus on aging and cancer. For this purpose we have established the following aims which we will address in the upcoming 5 years:

1) Determine the extent to which chronically present senescent cells promote physiological skin aging, induced either by intrinsic or extrinsic factors.

The objective of these projects is to characterize the role of senescent cells in promoting skin aging. Our working hypothesis is that chronic senescent cells induced by age, UV radiation or chemotherapy secrete factors in the local or systemic microenvironment which can serve as targets for novel therapeutic interventions for the treatment of different pathology of the skin.

2) Study the natural and artificial elimination of senescent cells from the skin.

The objective of this project is to identify the timing and the efficiency of naturally or artificially clearing senescent cells from the skin. Our working hypothesis is that chronic senescent cells induced by age, UV or chemotherapy are inefficiently removed and slowly accumulate in the skin, while acute senescent cells induced by wound healing are efficiently eliminated.

3) Determine the extent to which chronically-induced senescent cells promote melanoma and adverse reactions to the therapy.

The objective of this project is to characterize the role of senescent cells in promoting melanoma progression and adverse reactions to chemotherapy. Our working hypothesis is that the elimination of chronic senescent cells will decrease tumor progression and metastasis, and ameliorate the general health span of the animal through mitigation of side effects.

Our lab has 10+ years of experience in working with cellular senescence and the skin, has developed mouse models that will be used for these projects, and has invested very substantially in the various technical approaches that are required to complete this research project. These include treatment with damaging agents, wound healing, cells transplant, xenotransplant of cancer cells, induction of melanoma. Collectively, the availability of this methodology ensures feasibility of the proposed studies.

3.3 Relevance

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

The population in many parts of the world, including the Netherlands, is gradually aging. Life expectancy has increased by ~40 years in the last 150 years, and all evidence suggests that a further increase will take place. Unfortunately, this is accompanied by a larger population in need of medical treatments for the cure of several age-associated diseases. Among those, cancer is a devastating plague of our society, and for skin cancers, which count for the most represented cancers in the population, the rate of survival is very low when metastatic. Cancer treatments are often very toxic, and side effects often lead to the discontinuation of certain therapies, such as chemotherapy, in a large number of patients. Senescent cells are accumulated with age and after damaging anti-cancer therapies and cause several phenotypic changes in the tissues, including promotion of pro-inflammatory environment. Understanding why

senescent cells accumulate, the mechanisms that promote their aberrant behaviour and ways to counteract their harmful effect, represent an attractive avenue to develop new anti-aging and anti-cancer approaches.

3.4 Research strategy

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

The various aims that are as described in paragraph 3.2 will be pursued in parallel. Indeed, a specific aim might not only generate important data for the other aims, but also benefit from the other projects. This makes the overall project more harmonious and more focused on answering the main questions we hope to address. Different PhD students will be in charge of developing different tools we will be using for the project, and supported by a permanent team of experienced research technicians.

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

This proposal is divided in 3 different aims, which are detailed below. A combination of different animal procedures, which are explained in detail in the Appendix, will be employed in the 3 research questions. As a common tool to answer the following questions, we will use a new mouse model, the p16-3MR, that was recently developed by us (*Demaria et al, Dev Cell, 2014. 31:722-33*) and briefly described in Section 3.1. Of particular relevance for this proposal, using the p16-3MR mice we have been able to detect (by bio-luminescence) and inducibly eliminate (by ganciclovir administration) senescent cells generated by wound healing, ionizing radiation, aging and chemotherapy (*Demaria et al, Dev Cell, 2014. 31:722-33; Demaria et al, in preparation*). Moreover, we have been able to sort senescent cells from the skin of p16-3MR mice by exploiting the RFP portion of the transgene (*Demaria et al, Dev Cell, 2014. 31:722-33*). Thus, we believe the p16-3MR model represents a powerful and proved model to understand the role of senescent cells in vivo, and of exquisite and unique value for the aims here described:

1) Determine the extent to which chronically present senescent cells promote physiological skin aging, induced either by intrinsic or extrinsic factors.

During this project, we will characterize how and where senescent cells accumulate in the skin, and how their presence affects the skin physiology. We will study the skin of young (3-4 mos), middle age (12-16 mos) or old (20-26 mos) animals, of mice treated with UV or chemotherapy (██████████, ██████████) and of mice with small wounds (Appendix 1 – Induction and detection of senescence). Skin will be excised from different areas (Appendix 1) and fixed or cells isolated. We will perform histology and staining for different senescence markers, and to get more insights on the different factors induced in the skin, we will perform an unbiased characterization of the gene expression profiling using whole transcriptome sequencing and further validations. For doing these experiments we will use p16-3MR mice, which have the advantage of express a senescence-specific RFP and where we can artificially eliminate senescent cells by i.p. injections of the pro-drug Ganciclovir (GCV), and skh-1 mice (hairless – *Bissett et al, Photoch and Photobio, 1987. 46:367-378*), which represents a model where we can study the skin without shaving hair and causing small damages that can interfere with our finding.

At the end of this project we will have better insights of the factors and mechanisms involved during senescence-driven skin aging, identifying the genes and pathways which are specific of the chronic senescent cells and potentially discovering new candidates for the development of future targeted therapies for skin pathology.

2) Study the natural and artificial elimination of senescent cells from the skin.

During this project, we will measure the time needed to eliminate senescent cells from the skin. ██████████

██████████ Since we think that age impairs the rate of senescent cells clearance, while tissue repair accelerates, we will test the hypothesis that the clearance of senescent cells is dependent on the physiology of the skin. We will collect small biopsies of skin at different time points in order to determine the level of response of the immune system by histology and gene expression. Moreover, we will test whether previously characterized senolytic drugs (i.e. drugs that can specifically eliminate

senescent cells in other systems) are able to accelerate the removal of senescent cells from the skin (Appendix 2). For the whole project, we will use both C57BL6 mice. At the end of this project we will have better insights of the efficiency in eliminating physiologically or pathologically induced senescent cells, and of differences between transient and chronic senescent cells removal.

3) Determine the extent to which chronically-induced senescent cells promote melanoma and adverse reactions to anti-cancer therapy.

Different preliminary data on the role of senescent cells in promoting melanoma metastasis were obtained using an orthotopic system (by injecting B16 cells, which already are highly metastatic and directly colonize the lungs).

In the first setting, we will determine whether senescent cells chronically accumulated (with the stimuli described in Appendix 1) can enhance melanoma aggressiveness, quantified by metastasis in distal tissues (Appendix 3 - Melanoma and chemotherapy side effects). In the second setting, we will investigate whether therapy-induced senescent cells (UV radiation and/or chemotherapy) can promote adverse reactions, quantified by different metabolic and behavioral tests (Appendix 3). At the end of this project we will have better insights on the impact of removing senescent cells induced by different meaning to reduce cancer burden and chemotherapy side effects, which could candidate the targeting of senescent cells as an innovative approach for the cure of skin cancers.

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

All projects are focused on the central question as to how senescent cells are generated by different stimuli, and how they can contribute to different age-related pathologies, including cancer. The final goal will be to find molecular and cellular signatures that will be helpful to target the senescent cells with aberrant behaviours. The different aims listed in this proposal need extensive cross-talks, but will be investigated serially. Indeed, we plan to first setup our conditions to induce and detect senescence (Appendix 1). After the setup is completed, we will then move to the other 2 Aims, starting with the study of senescent cells clearance from the skin (Appendix 2) and followed by the characterization of senescent cells in the context of skin cancer (Appendix 3).

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	Induction and detection of senescence
2	Injection of senescent cells in the skin
3	Melanoma and chemotherapy side effects
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Induction and detection of senescence

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The primary goal of this project is to induce cellular senescence in the skin to measure the impact of senescent cells for tissue homeostasis. Secondary outcome parameters of these experiments are the correlation between the number of senescent cells and the phenotype of the skin, and to isolate the senescent cells generated for further molecular analysis. We will test the hypothesis that chronically-induced senescent cells promote deleterious phenotypes in the skin, and that their elimination can be exploited for future therapies. In order to cover different stresses that induce phenotypes of the skin in humans,

we will not only analyse the skin of old vs young mice, but also of mice treated with UV radiation (the most important environmental stress for skin aging) and chemotherapy (the most used anti-cancer treatment) and compare these chronically-induced senescent cells to the ones generated during wound healing, which we know being transient and beneficial for the process of optimal repair.

During the course of the experiments, we will regularly monitor the mice for senescence induction by in vivo bio-luminescence, as described in the next paragraph. During and at the end of each experiment we will collect skin biopsies from the dorsal skin. These biopsies will be used to: 1) extract RNA and proteins to measure different parameters of cellular senescence and skin health; 2) do immunohistochemistry and histology to determine the quality of the skin, the cellular and the extracellular matrix composition compositions, the presence of senescent cells and the number of immune cells; 3) isolate senescent cells by FACS sorting for further analysis and characterization.

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

We will have 4 different approaches to induce senescence. During these approaches, we will also monitor the bioluminescence of living p16-3MR mice, which express Renilla luciferase in a senescence-specific control. Since this is a non-invasive technique, we don't expect to have confounding results by using for further experiment the mice that are monitored.

The 4 approaches are:

- 1) Natural aging. Animals will be aged without any intervention. In the case of p16-3MR mice, where the treatment with Ganciclovir (GCV) can remove senescent cells, we will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV once daily for 5 consecutive days every 2 months starting at 12 months of age. Small biopsies of the dorsal skin (1-2 mm) will be collected between 4-6 months of age, 12-16 months of age, and 20-26 months of age. With these ages we should have a good range to cover young, middle age and old animals. The total number of groups will be 1, but we will double the number of animals since we expect to lose 50% of the cohort due to natural causes.
- 2) UV-radiation. The exposure to UV light will be limited to a small area of the dorsal skin (around 1 cm²). [REDACTED]
[REDACTED] Small biopsies of the dorsal skin (1-2 mm) will be collected at different time points during the experiment. This approach is necessary to mimic different sun exposure in the human population. In the case of p16-3MR mice, we will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV once daily for 5 consecutive days every 5 weeks (for regimen 1), every 3 weeks (for regimen 2) or after the end of the treatment only (for regimen 3). The total number of groups will be 4 (3 regimens + control).
- 3) Chemotherapy. [REDACTED]
[REDACTED] The choice of the drugs and the regimen is based on the chemotherapy regimen used in the clinic for skin cancer treatment. In the case of p16-3MR mice, we will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV once daily for 5 consecutive days 1 week after the end of each treatment. The total number of groups will be 4 (3 drugs + control).
- 4) Wound healing. Hair will be shaved from dorsal skin of the animals. The surgery site will be disinfected with alternating Betadine and 70% ethanol wash, then a small piece of dorsal skin will be punched using an 6-mm dermal biopsy punch. Mice will be euthanized at day 6, 10 and 14 after wound healing in order to collect skin biopsies. At these points, we expect induction of different type of senescent cells which we will use for comparison with the senescent cells originated in 1, 2 and 3. The total number of groups will be 4 (3 time points + control).

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

We are planning to use two different strains of mice, the above mentioned p16-3MR and the hairless mice skh1. The advantage of the p16-3MR mice relies on the detectability of senescent cells by bio-luminescence with a non-invasive method in living animals, and by the possibility of eliminating senescent cells by GCV. The advantage of the skh1 is that they don't need shaving of the fur, which might create confounding results due to the induction of senescence upon

tissue repair. Based on our experience and the literature, we will need 30 mice/treatment/strain, where 15 mice will be used for histology and 15 mice will be used to isolate senescent cells. A smaller number of mice (15) will be used per each group treated with GCV since we are planning to perform histology only. This will give a total of 45 p16-3MR mice/treatment and 30 skh1 mice/treatment. For the naturally aging animals, we will double the number of animals since we expect to lose 50% of the cohort due to natural causes (90 3MR and 60 skh1). However, for the wound healing intervention a smaller number of mice at each time point will be used, because this cohort will be used for isolation of senescent cells only (30 p16-3MR mice and 15 skh1 mice)

B. The animals

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

We plan to use p16-3MR mice, which have a C57BL/6 background, and Skh1 hairless mice, which have an Albino background. The p16-3MR mice are available from different laboratories in the Netherlands (RIVM, Bithoven; Erasmus Medical Center, Rotterdam). The skh1 are commercially available and can be purchased from Charles River (http://www.criver.com/files/pdfs/rms/us-model-pricing/rm_rm_c_skh1_mice.aspx).

As described in 2A, we aim to establish cohorts of 45 p16-3MR (30 untreated and 15 GCV-treated) and 30 skh1 mice for each treatment/intervention (with the exception of the wound healing cohort, with 15 mice/time point). Small biopsies of skin will be collected at different time points during/after treatments. We will minimize the size of the biopsy to 1-2 mm in order to reduce the invasiveness of the procedure. In our experience, mice fully recover after these small incisions in 3-5 days. Using biopsies gives us the advantage of following the progression of the skin phenotypes over-time in the same animal. To further limit the manipulation and distress of the animals we will limit the collection of biopsies at once a month. In the case of wound healing, mice will be euthanized for skin collection to avoid repetitive wounding. For the aging cohort, mice will be euthanized if signs of distress appear, but otherwise kept up to 26 months. In the case of skh1 mice the lifespan might be shorter, and we will keep the maximum age at 20 months. For the UV-treated cohort, mice will be euthanized maximum 15 weeks after the last treatment. For the chemotherapy cohort, mice will be euthanized maximum 10 weeks after the last treatment. For wound healing, mice will be euthanized maximum 3 weeks from the injury.

In total we estimate to use the following number of mice:

- P16-3MR -> 570 mice [90 animals x 1 treatment (aging) + 45 animals x 4 treatments (UV radiation) + 45 animals x 4 treatments (chemotherapy) + 30 animals x 4 time points (wound healing)]
- Skh1 -> 360 mice [60 animals x 1 treatment (aging) + 30 animals x 4 treatments (UV radiation) + 30 animals x 4 treatments (chemotherapy) + 15 animals x 4 time points (wound healing)]

We are planning to start with a small pilot (n=5) before moving to the full experiment. First, for the single cell sorting experiments, we will move to the full experiment only if able to isolate senescent cells from the skin. Second, for the evaluation of skin health, we will consider a "go" for performing the full experiment the evaluation of: 1) 10% difference in extracellular matrix composition between mice with or without senescence (measured by histology); or 2) 10% difference in cellular populations (histology/RNA); or 3) visual differences in the skin health (wrinkling, elasticity)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: We have many data on the nature of senescent cells in vitro, but we now need to confirm the evidence collected in vivo. Moreover, the influence of cellular senescence for skin homeostasis can't be replaced with any in vitro experiment.

Reduction: We have done several experiments of gene expression profiling of isolated cells and histology/staining of whole tissues. We have substantially reduced the number of mice per group (15) at the minimal to obtain statistical significance based on data we have generated in the past. In particular, we are using our data on the induction of p16 (marker of senescence) in the skin upon age or doxorubicin (measured by RNA or protein abundance) to estimate that we will need 15 mice/group to obtain statistical significance in our experiments in terms of senescence induction. By analysing mice with different backgrounds (p16-3MR and skh1) we think we will select phenotypes which are strongly affected by senescent cells and conserved in different systems, thus increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 15 mice in each experiment and treatment.

Refinement: All the procedures listed are meant to minimize the discomfort of the animals. We will reduce the size of the area of exposure to UV to minimize side targets of radiation. We will reduce the size of the skin biopsies to be collected at the minimal we can go for further analysis, which is the result of years of experience working with skin samples.

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

Suffering will be minimal, and most often absent. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed within our institute for any treatment, and any mouse experiencing unexpected suffering will be removed from the study and sacrificed

Repetition and duplication

E. Repetition

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

[REDACTED]. We have established collaborations with different other labs to monitor how senescent cells impact skin phenotypes. The other labs will focus on different mouse models with specific skin disease, which will give us a more comprehensive picture of differential disease-dependent roles of senescent cells. This study will be the first analyzing effects of specific removal of senescent cells for skin phenotypes, making it unique and completely different from another study done in the field of senescent cells removal (*Baker et al, Nature, 2011. 479:232-236*).

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort / humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

We will use analgesic only in case of wound healing. mice will be given analgesic during/after surgery. Since the area to be removed is small and superficial, we don't expect the need of using analgesic past the 12 hours following the surgery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms. For chemotherapy, mice will encounter mild fatigue and transient muscle weakness. Mice will fully recover 3-4 weeks after treatment. For wounding, there is a small risk (<2%) of developing infections

Explain why these effects may emerge.

For natural aging or after genotoxic drugs treatments, side effects can be due to transient anaemia, increase inflammation and impairment in the immune system functions. In case of wound healing, the wound will not be sutured to allow natural wound closure to occur

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and during treatment and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

For the aging cohort, we will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior and cachexia development according to the system set up in the facility. For the chemotherapy experiments, we will monitor the weight twice weekly, and increase to more frequent measures if necessary (if the body weight drops of more than 10%)

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. Careful (monthly) monitoring, most notably towards the end of their natural lifespan, should allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints. For chemotherapy-treated mice, the incidence of drug-related fatigue is high. Mice will be carefully monitored on a daily basis and animals showing humane endpoints will be sacrificed. For wounding, there is a small risk (<2%) of developing infections

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 for wound healing, moderate for chemotherapy and non-recovery for the aging study

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.

For the vast majority of the mice, we will not need to sacrifice the animals because we will only collect skin biopsies. A small subset of each group will be killed in order to collect additional organs for gene expression analysis

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Injection of senescent cells in the skin

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The primary goal of these experiments is to study the clearance of senescent cells from the skin. The secondary goal is to test whether we can accelerate the removal of senescent cells by administering a drug known to be specific in killing senescent cells in other systems. Preliminary data we and other generated suggest that age delays the clearance of senescent cells, while wound healing accelerates it. We will now test this hypothesis using C57BL6 mice, and using dermal cells derived from the p16-3MR which can be monitored by bio-luminescence and inducibly eliminated. We will collect skin biopsies at different time

points during the course of the experiment. The biopsies will be used to: 1) extract RNA and protein to monitor for inflammation, proliferation and senescence; 2) perform immunohistochemistry, histology and immunostaining to determine the levels of proliferation, senescence, immune cells invasion, apoptosis, autophagy and necrosis

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

The procedure of injecting dermal 3MR cells (fibroblasts) in the skin is quite simple. The cells will be induced to senescence in cell culture (by replicative exhaustion, UV-radiation or chemotherapy), counted and resuspended in PBS in sterile conditions. Cells will be then inoculated with a syringe on the dorsal skin of young (3-4 mos), middle age (12-16 mos) and old (20-26 mos) animals, or in wounded skin, by injecting them sub-cutaneously. We have used similar approaches to inject senescent cells under the skin in the past, and being able to show that cells of dermal origins will persist in the engraftment for several days. Wound healing will be induced using a 6-mm dermal biopsy punch on the dorsal skin. A subset of mice per each group will be treated with GCV (1 daily i.p. injection of 25 mg/kg for 5 consecutive days, 3 days after cells inoculation) or with the drug [REDACTED]

[REDACTED] During these experiments, we will monitor the bioluminescence of p16-3MR cells, which express Renilla luciferase in a senescence-specific control. With this approach we will be able to monitor senescent cells clearance occurring naturally or artificially. For this reason, 5 different time points after the inoculation of cells (1, 3, 7, 14 and 28 days) will be chosen to collect the area of the skin with the inoculated cells of the untreated animals to monitor immune cells infiltration and other events related to the elimination of senescent cells (apoptosis, necrosis, autophagy). The skin of the animals treated with GCV or [REDACTED] will be collected only when we observe the total clearance of senescent cells by bioluminescence.

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

We are planning to use WT C57BL/6 mice and inoculate p-16-3MR cells. The advantage of using these cells relies on the detectability of senescent cells by bio-luminescence with a non-invasive method in living animals, and by the possibility of eliminating the senescent cells by GCV. This will allow to substantially reducing the number of animals needed. Based on our experience and the literature, we will need 15 mice/treatment/time point to monitor senescent cells and isolate the skin for further analysis. This number is based on previous experiments for determining artificial senescent cell clearance [REDACTED]

We will then have 8 treatments/time points (control; 1, 3, 7, 14, 28 days after cell inoculation; [REDACTED]) in young, middle age, old or wounded animals

B. The animals

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

We plan to use C57BL/6 mice, which are syngeneic for the p16-3MR cells. These mice are commercially available or can be easily obtained at the animal Facility of the UMCG. We will use female mice, as for our previous experience they tend not to scratch their back upon injury and not to fight as much as male mice (which can delay the wound healing process).

Small biopsies of skin will be collected at different time points after the inoculation of senescent cells (1, 3, 7, 14 and 28 days). We will minimize the size of the biopsy to circa 3 mm in order to reduce the invasiveness of the procedure. A subset of mice will be euthanized at the time of collection. If not, mice will be monitored for longer times for up to 3 months (by bioluminescence). In our experience, mice fully recover after these small incisions in 5-6 days.

In total we estimate to use the following number of mice:

- WT C57BL/6 -> 480 (8 treatments/time points x 4 conditions x 15 mice/group)

We are planning to use 5 mice/group in a pilot study. During this pilot, we will need to be able to detect senescent cells by bio-luminescence and to see a response in terms of clearance (at least 40% of senescent cells eliminated) [REDACTED] before moving to the full experiment.

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: Clearance of senescent cells has been suggested to be due to different mechanisms. These mechanisms require massive interactions with the tissue microenvironment, including direct contact with other cell types and activation of immune system. Thus, the study of cellular senescence in terms of clearance is not possible in other systems than a mammal with an intact immune system.

Reduction: In order to reduce the number of animals to enrol in the study, we have decided to use cells derived from p16-3MR animals. This allows us to use the animal to monitor the disappearance of the cells in vivo, and to use the same animal for additional studies after biopsies. By monitoring the clearance through bio-luminescence and the level of infiltration of immune cells and other parameters related to cell clearance (apoptosis, necrosis, autophagy) in the same animal will allow to directly report the level of clearance to the potential mechanisms that participate, thus maximizing the biological information that we can derive from the experiment.

Refinement: All the procedures listed are meant to minimize the discomfort of the animals, particularly in regards of wound healing and collection of skin samples We will reduce the size of the skin biopsies to be collected at the minimal we can go for further analysis, which is the result of years of experience working with skin samples.

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

Suffering will be minimal, and most often absent. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed for aging mice within our institute for any treatment. Any mouse experiencing unexpected suffering will be removed from the study and sacrificed

Repetition and duplication

E. Repetition

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

We have generated the p16-3MR transgenic mice, and we have the advantage to have extensive experience working with the model. We have established a collaboration with other Institutes which will define the level of clearance in other tissues, including liver and eyes. This study will be the first analyzing the efficiency of removal of senescent cells from the skin, making it unique and completely different from other studies we are aware of from collaborators and Pubmed literature searches.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort / humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing process or after wounding will be removed from the cohort

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Aged animals are expected to develop various age-related symptoms. For mice with wounds, a small risk of developing infections exists (<2%)

Explain why these effects may emerge.

For natural aging, side effects can be due to anaemia, low blood cell counts, increase inflammation and impairment in the immune system functions. In case of wound healing, the wound will not be sutured to allow natural wound closure to occur.

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia, tumor development, infections and necrosis according to the system set up in the Animal Facility.

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. Careful (monthly) monitoring, most notably towards the end of thier natural lifespan, should allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints. For infections in wounds, we have an extensive experience and the calculate incidence is very low (<2%)

K. Classification of severity of procedures

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

mild and non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

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

Harvesting of bigger areas of skin requires sacrificing **of** mice.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		3	Melanoma and chemotherapy side effects

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The primary goal of this project is to study whether the clearance of senescent cells induced by different stimuli is sufficient to delay progression of melanoma. The secondary goal is to test whether the presence of senescent cells contributes to side effects of standard anti-cancer therapies (chemotherapy). Preliminary data we and other generated suggest that removal of senescent cells contribute to reduce cancer spread. Moreover, we have demonstrated that doxorubicin-induced senescent cells cause fatigue of treated mice, and their removal can ameliorate physical activity. Now we want to: 1)

Study the contribution of senescent cells induced by age, UV-radiation or chemotherapy to the progression of naturally occurring melanomas (in a transgenic model); 2) Extend the characterization of the side effects of chemotherapy with rely on induction of senescent cells.

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

To study the effect of removing senescent cells on melanoma progression and chemotherapy side effects, we will use the p16-3MR mouse, which allows detection and elimination of senescent cells. We will breed the mouse into a well-established model of melanoma, [REDACTED]

[REDACTED] Since we are interested to understand the role of chronic senescence in initiating and promoting melanoma progression, we will induce 3 different approaches. In the first 2 approaches, we will ask whether the presence of senescence in the skin prior to tumor induction can create a microenvironment that favors tumor initiation and progression. Similarly to the biggest cause of skin melanoma in humans, we will use chronologic (or natural) or photoaging (UV-radiation) as inducer of senescent cells. In the second approach, we will ask whether senescent cells that are generated by therapy, after the tumor is induced, can promote cancer relapse.

- 1) Aging. Natural aging. Animals will be aged without any intervention. We will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV or with vehicle daily for 5 consecutive days every 2 months starting at 12 months of age. Cohorts of mice at 3-5 months of age (controls) and 20-26 months of age will be treated with tamoxifen to induce the melanoma. A subset of mice will be euthanized at 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days after tamoxifen treatment and tissues extracted for further analysis to determine metastasis burden. The total number of groups will be 24.
- 2) UV-radiation. Mice will be exposed to UVA/B 4 times weekly for 12 weeks from 6 weeks of age (starting with 1 KJ/cm²/5 min up to 6 KJ/cm²/30 min). We will i.p. inject the animals daily with 25 mg/kg of GCV for 5 consecutive days every 3 weeks. After the last cycle, mice will be topically treated with Tamoxifen. A subset of mice will be euthanized at 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days after tamoxifen treatment and tissues extracted for further analysis to determine metastasis burden. The total number of groups will be 12 (we will use same controls as for the natural aging).
- 3) Chemotherapy. Drug treatment will be given to mice in the presence or absence of melanomas. This way, we will be able to monitor different metabolic, behavioural and activity parameters differentially regulated by senescent cells per se, and discriminate these from the secondary effects due to reduced tumor burden. We will use 3-5 months old mice: half of the mice will be treated with tamoxifen, half with vehicle. 7 days later, three different drugs will be used (independently). [REDACTED]

[REDACTED]. At the end of the chemotherapy cycle, we will i.p. inject the animals with daily 25 mg/kg of GCV for 5 consecutive days 1 week after the end of each treatment. Mice without cancer (no tamoxifen treatment) will be monitored every week for up to 16 weeks (parameters/technique described below). Mice with cancer will be monitored every week for up to 4 weeks. A subset of mice carrying melanoma will be euthanized at 0, 7, 14, 21 and 28 days after the last GCV treatment. The total number of groups will be 36 (we will use same controls as for the natural aging).

For the chemotherapy experiments we will monitor the following parameters:

- Metabolism. We will use calorimetric (also defined as metabolic) cages and monitor for respiration and calorimetry (O₂, CO₂, food, water, calories consumptions). Mice will be single housed for 4 days for acclimation in home cages before being monitored in metabolic cages for 24-48 hours.
- Activity. We will measure spontaneous activity using static running wheels. Mice will be single housed in home cages for 4 days for acclimation, followed by recording physical activity using running wheels for up to 7 times (each time for 8-12 hours at night). Mice will be kept in home single cages during the day and moved to static cages at night for recording the activity.
- Behavior. We will monitor behavior of mice using rotor-rod and open field measurements for 15-30 minutes. Despite not comprehensive, this behavioral assessment will give us an ideal pilot study to collect sufficient preliminary data for further experimentations. At this stage, we will not be able to discriminate between neurocognitive or muscular impairments, but we can expect both to be promoted by the presence of senescent cells.

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

We are planning to measure several parameters in the same animals. The design of the experiment is outlined to reduce the number of animals to the minimum. Indeed, we plan to use the same controls for multiple use, thus optimizing numbers. Based on data in cell culture and in other models, we can expect a 20-25% difference in tumor burden and response to chemotherapy between GCV and non-GCV treated animals. Thus, we have computed that 20 mice/group are needed.

B. The animals

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

[REDACTED]

The number of mice is minimized by optimizing the experimental readout (i.e. every single mouse is monitored with different parameters). Study of cancer and effects of therapies is possible only by analysing several tissues. Thus, mice will be sacrificed at different time points to collect the tissues needed for analysis (See description in A for details).

In total we estimate to use the following number of mice:

- P16-3MR -> 360 (18 groups x 20 mice/group)
- [REDACTED] -> 1080 (54 x 20 mice/group)

We are planning to start with a subset of mice to generate preliminary data (n=6/group). We have set specific parameters to monitor in order to move to the full experiment (adding n=14/group). For aging, UV-radiation and chemotherapy we will expand our study only if we will be able to see clear differences in metastasis burden quantified as: 1) at least 20% (on average) reduction in number of metastasis in the GCV-treated mice; or 2) at least 20% (on average) reduction in size of metastasis in the GCV-treated mice; or 3) at least 1 week delay in metastasis onset in the GCV-treated 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: Cancer and effects of cancer therapies require the study of interactions among different cells and tissues, and the impact of the circulation.

Thus, there is no alternative from using a complex organism. We minimize the use of animals to the study of very complex functions, and rely on cell culture for several preliminary data (for examples, the study how specific factors can cause survival, growth or change in metabolism in a specific cell type will be done in vitro)

Reduction: In order to reduce the number of animals to enrol in the study, we have decided to analyse several parameters in the same mouse. This allows us to use the same animal to monitor the appearance of different phenotypes related to fatigue and metastasis, and to use the same animal for additional studies after tissue collection.

Refinement: By monitoring the different parameters related to fatigue and metastasis and gene expression profiling in single animals gives us a powerful tool to phenotype the mice in relation of specific patterns of proteins and genes.

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

Suffering will be moderate, and most often minimal. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed within our institute for any treatment, and any mouse experiencing unexpected suffering will be removed from the study and sacrificed. Mice with cancer will be followed according to the Code of Practise Kankeronderzoek

Repetition and duplication

E. Repetition

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

We have established a collaboration to test different compounds with functions in killing senescent cells (but with potential off targets effects) for the amelioration of side effects of chemotherapy. This study will be the first analyzing the genetic removal of senescent cells after chemotherapy, making it unique and completely different from other studies we are aware of from collaborators and Pubmed literature searches.

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.

A subset of mice will be house for 24-48 hours in metabolic (or calorimetric) cages

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.

We will comply with the code of Practise Kankeronderzoek

Classification of discomfort / humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing or metastatic process will be removed from the cohort

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms. Mice with metastasis will develop different functional issues in the organs targeted by the cancer (lung, liver). The treatment with chemotherapy, despite beneficial in reducing cancer spread, will give adverse effects including fatigue and muscle weakness. The goal of our research is to demonstrate that elimination of senescent cells ameliorate these side effects, together with delaying cancer progression.

Explain why these effects may emerge.

For natural aging in the presence of tumors and after genotoxic drugs treatments, side effects can be due to transient anaemia, increase inflammation and impairment in the immune system functions.

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia, tumor development, infections and necrosis according to the system set up in the Animal Facility.

Indicate the likely incidence.

For aged mice and mice with cancer metastasis the risk is (obviously) high. Careful (monthly) monitoring, most notably towards the end of the experiment, should allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints. For chemotherapy treatments, side effects are variable and mostly

reversible

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 and non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

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

Avoid to develop too invasive phenotypes, monitored by roughing of the fur and excessive weight loss (>15%). We will comply with the code of Practise Kankeronderzoek, particularly in terms of cancer size.

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

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer (Interne RuG code **8038**)
2. Titel van het project: **Cellular senescence in aging and cancer**
3. Titel van de NTS **Cellulaire veroudering tijdens algemene veroudering en bij kanker**
4. Type aanvraag:
x **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam: DEC-RUG
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] / [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: **05-11-2015**
 - ☐ aanvraag compleet: **05-11-2015**
 - ☐ in vergadering besproken: **13-11-2015**
 - ☐ anderszins behandeld: **24-11-2015**
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: **16-11-2015 tot 17-11-2015**
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - ☐ aanpassing aanvraag: **17-11-2015**
 - ☐ advies aan CCD: **02-12-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-11-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:
- **General questions/remarks on appendices:**
- From the appendices, particularly appendix 1 and 2, it is not always clear what parameters are measured during/after the experiment. Can you more clearly indicate this?
- From the appendices it is not clear if male or female animals are going to be used. Can you indicate this and, if appropriate, justify/substantiate the choice for a particular gender?
- Can you provide clear go/no go decision for the experiments in appendices (and, if appropriate, for appendices) and substantiate them?
- **Appendix 1:**
- In appendix 1, under **D. Replacement, reduction, refinement**, the choice for 15 animals per group seems to be arbitrary. It is not stated on which assay(s)/outcome(s) this choice is based. Can you provide a better description of the estimation/calculation of the appropriate group size?
- **Appendix 2:**
- Can you provide a better description of the estimation/calculation of the appropriate group size?
- Datum antwoord: **17-11-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

☒ **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **JA**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **JA**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **n.v.t.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

Bijlage1-3: JA

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen.**

Nee, de voorgestelde experimenten in de drie deelprojecten hebben een logisch verband, en kunnen alleen uitgevoerd worden in een intact organisme

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

De aanvragers hebben ruime ervaring met het voorgestelde diermodel. De drie bijlagen zijn onderling samenhangend en go-no go beslismomenten zijn aangegeven om het aantal dieren te beperken. Het aantal dieren is waar mogelijk statistisch onderbouwd en keuzes voor (indien relevant) geslacht is beargumenteerd.

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.

In de dierproeven wordt de research code kankeronderzoek in dieren gehanteerd. Humane eindtermen zijn gedefinieerd.

In zijn geheel is de aanvraag in overeenstemming met de 3V's

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

De achtergrond van deze projectbeschrijving is een heldere uiteenzetting van aanleiding, achtergrond en context van het voorgestelde onderzoek. Het medisch en maatschappelijk belang van de voorgestelde dierproeven is helder, huidkanker is een groot probleem en zeker melanomen zijn moeilijk behandelbaar. Het voorgestelde onderzoek kan bijdragen aan een betere behandeling.

D. Ethische afweging

Het directe doel van dit project is om de rol van 'senescent' cellen in zowel de veroudering van de huid als in andere verouderingsziekten, zoals kanker te karakteriseren. Dit directe doel beoogt bij te dragen aan

het uiteindelijke doel om nieuwe mogelijkheden te creëren voor de behandeling en genezing van huidkanker en andere huidverouderingsziekten. De DEC beantwoordt de centrale morele vraag of dit directe en uiteindelijke doel ethisch gerechtvaardigd is positief.

De DEC baseert zich daarbij op de volgende ethische afweging. Allereerst oordeelt zij dat het project een toetsbare eenheid is. Er worden drie parallel-onderzoeken uitgevoerd die alle volledig zijn uitgewerkt (inclusief go, no-go afwegingen: 1) inductie en detectie van senescence; 2) injectie van senescent cellen in de huid; 3) neveneffecten van melanomen en chemotherapie. Deze deelonderzoeken dragen alle bij aan de beantwoording van de hoofddoelstelling van het onderzoek. Zoals hierboven beschreven heeft de onderzoeker op navolgbare wijze aangetoond dat dierproeven met muismodellen noodzakelijk zijn. Maar binnen dat gegeven wordt op zorgvuldige wijze met de 3 V's omgegaan (zie hierboven). De mate van ongerief (gematigd) achten wij voor dit project te rechtvaardigen, mede ook gegeven de maatregelen die worden genomen om in te grijpen bij mogelijke incidenten. De kennis en ervaring van de uitvoerders wettigen ook de verwachting dat de doeleinden gehaald zullen worden. Last but not least is voor de DEC het hierboven reeds genoemde maatschappelijk belang dat een toegenomen inzicht in de rol van senescent huidkanker tot betere behandeling kan leiden een belangrijke overweging in deze ethische afweging.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,
9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015339

Bijlagen

2

Datum 3 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015339. 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: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 01179037
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2015
Geplande einddatum: 31 december 2020
Titel project: Cellular senescence in aging and cancer
Titel niet-technische samenvatting: Cellulaire veroudering tijdens algemene veroudering en bij kanker
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713 AV Groningen
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Groningen Datum - -



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,
9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015339

Bijlagen

2

Datum 3 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 3 december 2015

Vervaldatum: 2 januari 2016

Factuurnummer: 15700339

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015339	€ 741,00

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

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 18 januari 2016 9:20
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Dank u wel voor uw reactie. We geven het door aan de CCD en zullen daarna zo snel mogelijk de beschikking naar u toesturen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 15 januari 2016 12:54
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Dank voor Uw toelichting op het voorgenomen besluit. Wij zijn akkoord met de door de CCD gestelde voorwaarde, hieronder verder gespecificeerd.

- For Section 3.4.4.2 (injection of senescent cells in the skin), we agree to use females only in case of wound healing, and an equal number of males and females in the ageing study.
- For Section 3.4.4.3 (melanoma and chemotherapy), we would like to follow your suggestion and perform a pilot study using males and females. A pilot study for the experiment has already been described in the Application. We will include in the pilot study an equal number of males and females. If the pilot study suggests that females and males have substantial differences, particularly in terms of variability, we will contact the CCD to discuss how to perform the full study. If the pilot study suggests no differences between genders, we will complete the full study using an equal number of males and females.

Mocht U nog aanvullende vragen hebben, dan horen we dit graag.

Hartelijke groet,

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: vrijdag 15 januari 2016 10:15

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Op 14 januari 2016 hebben wij bericht ontvangen dat u akkoord gaat het opschorten van de behandeltermijn. Dit maakt het voor de CCD mogelijk u in de gelegenheid te stellen te reageren op het voorgenomen besluit en eventueel aanvullende informatie te verstrekken voordat de CCD haar voorgenomen besluit definitief maakt.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens uw aanvraag goed te keuren. De CCD wil echter wel een voorwaarde toevoegen aan de vergunning. De voorwaarde en de argumentatie hiervoor vindt u hieronder.

Voorgenomen voorwaarde:

Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. U kunt een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

Onderbouwing:

U heeft aangegeven voor dierproef 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. De CCD kan zich voorstellen dat het openkrabben van de wond het wondhelingsproces zodanig verstoort dat geen conclusies getrokken kunnen worden uit proeven waarbij wondheling bestudeerd wordt indien ook mannelijke dieren gebruikt worden. De CCD is echter van mening dat u niet voldoende heeft onderbouwd waarom voor het beantwoorden van de overige vraagstellingen in dierproef 3.4.4.2 (de rol van veroudering) niet ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden.

U heeft daarnaast aangegeven voor dierproef 3.4.4.3 alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van alleen mannelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht.

De CCD is van mening dat u niet wetenschappelijk heeft aangetoond dat de menstruele cyclus in vrouwelijke dieren de ontwikkeling van melanoom in die mate beïnvloedt dat uw doelstellingen niet meer bereikt kunnen worden indien ook vrouwelijke dieren gebruikt moeten worden.

Met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, is de CCD is om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken bij de beantwoording van de individuele

vraagstellingen.

U wordt in de gelegenheid gesteld te reageren op de voorgenomen voorwaarde. Uw reactie en eventueel aangeleverde aanvullende informatie zal de CCD in overweging nemen voordat zij haar voorgenomen besluit definitief maakt.

U wordt verzocht deze informatie uiterlijk donderdag 21 januari 2016 aan te leveren. Indien wij dan niets van u gehoord hebben, gaan wij er van uit dat u geen gebruik wilt maken van de mogelijkheid de aanvullende informatie te verstrekken en zal het voorgenomen besluit van de CCD definitief worden gemaakt.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mocht u over bovenstaande nog vragen hebben, dan horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl
(Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [Redacted]

Verzonden: donderdag 14 januari 2016 18:32

Aan: Info-zbo

Onderwerp: Re: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Het uitstel is akkoord.

Hartelijke groeten

[REDACTED]

Verstuurd vanaf mijn iPhone

Op 14 jan. 2016 om 16:44 heeft Info-zbo <info@zbo-ccd.nl> het volgende geschreven:

Beste [REDACTED]

Wij vragen jullie inderdaad akkoord te gaan met 3 weken extra behandeltime. Hoewel we voor deze aanvraag nog niet aan de 40 werkdagen zitten (die verloopt op 29 januari), moeten we toch jullie toestemming hiervoor vragen. Wij mogen de termijn namelijk alleen zelf opschorten als wij vragen stellen voordat er een besluit genomen wordt. In dit geval heeft de CCD de aanvraag al besproken en een voorlopig besluit genomen. We willen jullie echter graag in de gelegenheid stellen nog te reageren voordat het besluit definitief gemaakt wordt. Indien jullie reactie daar aanleiding toe geeft kan de CCD haar besluit dan nog herzien. Formeel hebben we daarom nu jullie toestemming nodig om de tijd te stoppen. Als jullie hiermee akkoord gaan en een reactie sturen zal de CCD jullie reactie in de volgende CCD vergadering bespreken. We zullen voor deze aanvraag dan uiteindelijk een aantal werkdagen over de 40 werkdagen heengaan. Als jullie op tijd kunnen reageren betekent het dus niet dat we 3 weken over de 40 werkdagen gaan, maar slechts een aantal dagen.

Zodra jullie akkoord gaan, zal ik jullie laten weten wat het voorgenomen besluit is waar we jullie vragen om op te reageren.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Van: [REDACTED]

Verzonden: donderdag 14 januari 2016 14:57

Aan: Info-zbo

Onderwerp: RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Even voor de zekerheid: jullie vragen of we akkoord zijn met de extra 3 weken behandeltijd om de door jullie gestelde vragen te beantwoorden, toch?

Groeten

[REDACTED]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: donderdag 14 januari 2016 14:49

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Wij hebben u op woensdag 12 januari 2016 onderstaande e-mail gestuurd. In deze e-mail hebben wij echter geen reactietermijn genoemd. U wordt verzocht ons uiterlijk vrijdag 15-1-2016 te laten weten of u akkoord gaat met het opschorten van de termijn.

Indien wij op 15-1-2016 niets van u gehoord hebben, gaan wij er van uit dat u geen gebruik wilt maken van de door de CCD geboden mogelijkheid te reageren op het voorgenomen besluit.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl
(Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo

Verzonden: woensdag 13 januari 2016 14:07

Aan: [Redacted]

CC: [Redacted]

Onderwerp: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Geachte [Redacted]

De CCD heeft uw aanvraag besproken. Voordat zij een besluit neemt over uw aanvraag, wil zij u in de gelegenheid stellen te reageren op het voorgenomen besluit. Om u hiervoor de gelegenheid te kunnen geven en uw aanvraag vervolgens opnieuw tijdens de CCD vergadering te kunnen bespreken, dienen wij de behandeltermijn echter op te schorten.

Indien u gebruik wilt maken van de mogelijkheid te reageren op het voorgenomen besluit, verzoeken wij u in te stemmen met het opschorten van de behandeltermijn met maximaal 3 weken.

Indien u akkoord gaat met het opschorten van de behandeltermijn, zullen wij u daarna verder informeren over het voorgenomen besluit.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl
(Let op: nieuw e-mail adres)

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld

worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 7 januari 2016 16:20
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

De ongerief classificatie voor de aging studie is door de onderzoeker onterecht als terminaal (non-recovery) bestempeld. Dit zou mild ongerief moeten zijn. Dit is er doorheen geglipt bij de beoordeling. Voor de UV studie zou ook mild ongerief gelden. Door de DEC is tevens ruggenspraak gehouden met de onderzoekers die bovenstaande conclusies onderschrijven. De DEC zal er beter op letten

[REDACTED]

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: donderdag 7 januari 2016 10:59
To: [REDACTED]
Subject: RE: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Beste meneer [REDACTED]

Deze vragen zijn niet naar de aanvrager gestuurd, omdat wij in dit geval graag specifiek van de DEC wilde weten waarom zij de ongeriefsclassificatie zoals beschreven in de aanvraag als correct heeft ingeschat. Wij ontvangen graag zo snel mogelijk uw antwoord op deze vragen zodat de behandeling van deze aanvraag geen vertraging oploopt.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 7 januari 2016 10:42
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: Re: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Uw vragen in onderstaande mail van 24 dec. heb ik afgelopen maandag van het secretariaat doorgestuurd gekregen (i.v.m. de tussenliggende feestdagen en kerstvakantie is dit tot het nieuwe jaar blijven liggen).

Het is mij onduidelijk of deze vragen ook richting onderzoeker zijn gegaan (lijkt in dit geval wel opportuun).

U wilde uiterlijk dinsdag 5 januari een antwoord, maar dat lukte duidelijk niet (mede veroorzaakt door de tussenliggende feestdagen en kerstvakantie).

Ik zal de vragen doorsturen naar de DEC.

Gr.

[Redacted signature]

[Redacted signature]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: donderdag 24 december 2015 11:44

Aan: [Redacted]

Onderwerp: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning in behandeling waar u ons advies over heeft gegeven. Het gaat om het project "Cellular senescence in aging and cancer" met aanvraagnummer AVD105002015339. Wij hebben nog twee vragen over de ongeriefsclassificatie in dierproef 3.4.4.1.

In dierproef 3.4.4.1 is de ongeriefsclassificatie voor de verouderingsstudie ingeschat als terminaal. Wij zijn van mening dat de ongeriefsclassificatie voor de verouderingsstudie (dierproef 3.4.4.1) niet als terminaal kan worden ingeschat, aangezien dieren vanaf een leeftijd van 12 maanden gedurende vijf dagen dagelijks geïnjecteerd worden met Ganciclovir. Dit wordt elke 2 maanden herhaald. Daarnaast worden er huidbiopsies genomen. Dit past niet bij de definitie van 'terminaal'. Indien u van mening bent dat het ongerief toch als 'terminaal' zou moeten worden ingeschat, verzoeken wij u dit toe te lichten. Indien u het met ons eens bent dat dit niet de juiste inschatting van het ongerief is, verzoeken wij u ons te laten weten hoe u het dan ongerief inschat.

De aanvrager heeft daarnaast de ongeriefsclassificatie voor de UV bestralingsstudie niet weergegeven. Kunt u aangeven hoe u de ongeriefsclassificatie voor deze studie inschat?

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de eerstkomende vergadering wil behandelen, zouden wij uw toelichting graag uiterlijk dinsdag 5 januari 2016 ontvangen.

Bij voorbaat hartelijk dank,

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,
9713 AV Groningen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD105002015339

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 19 januari 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 02 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Cellular senescence in aging and cancer' met aanvraagnummer AVD105002015339. 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).

Uw aanvraag omvat drie verschillende bijlagen dierproeven. De ongeriefsclassificaties voor twee studies beschreven in bijlage 3.4.4.1 'Induction and detection of senescence' zijn in de vergunning, na overleg met de DEC, aangepast. Wij zijn van mening dat het ongerief van de dieren in de verouderingsstudie als licht zou moeten worden ingeschat in plaats van terminaal. Het ongerief van de dieren tijdens de UV bestralingsstudie zou ook als licht moeten worden ingeschat. Deze inschatting ontbrak in uw aanvraag.

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) In artikel 1d juncto artikel 10 lid 2 aanhef en onder sub a Wod is opgenomen dat, indien er verschillende methoden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt gekozen voor de dierproef waarbij een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Onderstaande voorwaarde ziet toe op het verminderen van het aantal in voorraad gedode dieren. Bovendien heeft de CCD vast uitvoeringsbeleid opgesteld waarin dit ethische aspect is opgenomen.

U heeft in uw aanvraag aangegeven voor bijlage 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. Wij kunnen ons voorstellen dat het openkrabben van de wond het wondhelingsproces zodanig verstoort dat geen conclusies getrokken kunnen worden uit proeven waarbij wondheling bestudeerd wordt indien ook mannelijke dieren gebruikt worden. Wij zijn echter van mening dat u niet voldoende heeft onderbouwd waarom voor het beantwoorden van de overige vraagstellingen in dierproef 3.4.4.2 niet ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden. U heeft daarnaast aangegeven voor dierproef 3.4.4.3 alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van

alleen mannelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. Wij zijn van mening dat u niet wetenschappelijk heeft aangetoond dat de menstruele cyclus in vrouwelijke dieren de ontwikkeling van melanoom in die mate beïnvloedt dat uw doelstellingen niet meer bereikt kunnen worden indien ook vrouwelijke dieren gebruikt moeten worden.

Met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, zijn wij om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken bij de beantwoording van de individuele vraagstellingen. Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten daarom in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. U kunt een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor ons aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

Op 15 januari 2016 hebben wij u in de gelegenheid gesteld te reageren op ons voorgenomen besluit. U heeft aangegeven akkoord te gaan met de voorwaarde zoals hierboven toegelicht en in de vergunning beschreven.

2) Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Cellular senescence in aging and cancer' starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2016 tot en met 31 december 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG d.d. 02 december 2015. De DEC heeft ons op 07 januari 2016 aanvullend geadviseerd naar aanleiding van een vraag over de ongeriefclassificaties in bijlage 3.4.4.1. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. We nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

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

Datum

19 januari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002015339

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).

De Centrale Commissie Dierproeven



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen**- Vergunning**

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen
Postbus: A. Deusinglaan 1
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project 'Cellular senescence in aging and cancer' met aanvraagnummer AVD105002015339, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat wij van mening zijn dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt kunnen worden. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning. In overleg met de DEC zijn de ongeriefsclassificaties in bijlage 3.4.4.1 "Induction and detection of senescence" aangepast.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Group leader.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 02 december 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 december 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 december 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 december 2015;
 - d. Reactie van aanvrager op voorgenomen besluit, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 januari 2016;
 - e. Aanvullend advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 07 januari 2016

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Induction and detection of senescence	Muizen	570	Wondgenezing: Licht Chemotherapie: Matig UV bestraling: Licht Veroudering: Licht
3.4.4.2 Injection of senescent cells in the skin	Muizen	480	Licht
3.4.4.3 Melanoma and chemotherapy side effects	Muizen	360	Licht

Voorwaarden

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

- 1) Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. De aanvrager kan een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

Algemene voorwaarde

- 2) 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

Datum

19 januari 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD105002015339

worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt

Datum

19 januari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002015339

onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 20 januari 2016 9:47
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag projectvergunning AVD105002015339

Geachte [REDACTED]

Op 02 december 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Cellular senescence in aging and cancer' met aanvraagnummer AVD105002015339.

De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen. De CCD heeft wel een aanvullende voorwaarde aan de vergunning verbonden. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Langs deze weg willen wij u graag informeren over de door de CCD gestelde voorwaarde aan de projectvergunning.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. De aanvrager kan een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

De reden voor deze voorwaarde is als volgt:

In artikel 1d juncto artikel 10 lid 2 aanhef en onder sub a Wod is opgenomen dat, indien er verschillende methoden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt gekozen voor de dierproef waarbij een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Onderstaande voorwaarde ziet toe op het verminderen van het aantal in voorraad gedode dieren. Bovendien heeft de CCD vast uitvoeringsbeleid opgesteld waarin dit ethische aspect is opgenomen.

De aanvrager heeft in de aanvraag aangegeven voor bijlage 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. De overwegingen voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren in deze dierproef heeft de aanvrager ook in uw aanvraag toegelicht. Wij kunnen ons voorstellen dat het openkrabben van de wond het wondhelingsproces zodanig verstoort dat geen conclusies getrokken kunnen worden uit proeven waarbij wondheling bestudeerd wordt indien ook mannelijke dieren gebruikt worden. Wij zijn echter van mening dat de aanvrager niet voldoende heeft onderbouwd waarom voor het beantwoorden van de overige vraagstellingen in dierproef 3.4.4.2 niet ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden. De aanvrager heeft daarnaast aangegeven voor dierproef 3.4.4.3 alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De overwegingen voor het gebruik van alleen mannelijke dieren in deze dierproef heeft de aanvrager ook in de aanvraag toegelicht. Wij zijn van mening dat de aanvrager niet wetenschappelijk heeft aangetoond dat de menstruele cyclus in vrouwelijke dieren de ontwikkeling van melanoom in die mate beïnvloedt dat de doelstellingen niet meer bereikt kunnen worden indien ook vrouwelijke dieren gebruikt moeten worden.

Met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, zijn wij om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken bij de beantwoording van de individuele vraagstellingen. Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten daarom in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. De aanvrager een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor ons aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

Op 15 januari 2016 hebben wij de aanvrager in de gelegenheid gesteld te reageren op ons voorgenomen besluit. De aanvrager heeft aangegeven akkoord te gaan met de voorwaarde zoals hierboven toegelicht..

Daarnaast hebben wij na overleg met u de ongeriefsclassificaties in bijlage 3.4.4.1 aangepast.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,



Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl