

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171684	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Adviesnota CCD		x						x	
8	Beschikking en vergunning				x		x			



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

<b>1.1</b>	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
<b>1.2</b>	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Universiteit Maastricht Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED] KvK-nummer 50169181
<b>1.3</b>	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer Minderbroedersberg 4-6 Postbus 616 Postcode en plaats 6200 MD Maastricht IBAN NL04 INGB 0679 5101 68 Tenaamstelling van het rekeningnummer Universiteit Maastricht
<b>1.4</b>	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] Functie Hoogleraar Afdeling [REDACTED] Telefoonnummer 0 [REDACTED] E-mailadres [REDACTED]
<b>1.5</b>	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] Functie promovendus Afdeling [REDACTED] Telefoonnummer 0 [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 | IvD Maastricht                               | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |                                              |                                                            |
| Afdeling                    |                                              |                                                            |
| Telefoonnummer              |                                              |                                                            |
| E-mailadres                 | ivd-secretariaat-cpv@maastrichtuniversity.nl |                                                            |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 15 - 4 - 2017 |
| Einddatum  | 15 - 4 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de rol van calciumfosfaat in botregeneratie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| Naam DEC    | DEC UM                                   |
| Postadres   | Postbus 616, 6200 MD Maastricht          |
| E-mailadres | secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 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	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Maastricht [REDACTED]
Datum	9 - 5 - 2017 [REDACTED]
Handtekening	[REDACTED]



## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

The golden standard for bone reconstruction is an autograft, however, the use of autograft is associated with important drawbacks such as limited availability and side effects of grafting procedure. As a consequence, there is an increasing interest in improved synthetic bone graft substitutes, the biological performance of which is still considered inferior to that of natural grafts (1).

Synthetic bone graft substitutes, often calcium phosphate (CaP)-based ceramics, with chemical composition comparable to that of bone mineral, can be produced in large quantities, against relatively low cost (2,3). While this type of material has been clinically used for decades, only recently a family of such materials has been developed, with well-defined physico-chemical properties that are considered as a comprehensive alternative to natural bone grafts. This is largely due to their intrinsic osteoinductive potential, which was so far believed to be a property characteristic of biologics, such as bone morphogenetic proteins (BMPs). While ample knowledge exists of properties, which are important for a biomaterial to be osteoinductive, the exact biological mechanism has not been described yet (4). One of the reasons is that osteoinductivity of biomaterials is tested using in vitro experiments; such a system does not allow for the in-depth study of biological mechanisms. In the past years, we have established an in vitro system, using culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on different biomaterials, which has a good predictive value for the in vivo response in terms of bone formation(5). However, to understand the exact bone formation mechanism, the calcium phosphate materials need to be implanted in vivo, as bone formation does not take place in vitro. Such a system will undoubtedly provide new insights into pathways eventually leading to new bone formation. This, in turn, can be used for iterative improvements of bone regenerative strategies using synthetics or biologics.

CaP ceramics are suitable for treating small size bone defect, but for generating bone in critical size defects, a common strategy is to combine the ceramics with autologous cells before implantation (1). Newly formed bone is formed through a complex mechanism which is dependent on many biological and physico-chemical elements. The exact role of each of these factors during different stages of bone formation is still not determined. However, the role of some proteins, also known as osteogenic markers, is imperative and essential in these cellular processes. To obtain further insight into the mechanism of bone formation, Here, we attempt to design and test materials that trigger the expression of such proteins and ENPP1. ENPP1, or Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1, is the gene encoding for the protein Plasma Cell Glycoprotein 1 (PC-1), a type II transmembrane glycoprotein that is involved in the regulation of mineralization in several tissues (6). Hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (TCP) are extensively used CaP ceramics in orthopedic applications, however, the two ceramics possess different properties. For example, the biodegradation of TCP is faster than that of HA; the biological performance, in terms of osteoinductivity and osteoconductivity (i.e. ectopic and orthotopic bone formation) is different. HA has been shown a less appropriate candidate for treating critical sized bone defect when compared with TCP. The hypothesis is that the differences in bone regenerative potential between the two ceramics are due to differential expression of proteins, such as ENPP1 by the cells in close vicinity to the materials.

#### References:

- [1] Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, de Boer J, Barradas AMC, de Ruiter A, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13614–9.
- [2] Shih Y-R V, Hwang Y, Phadke A, Kang H, Hwang NS, Caro EJ, et al. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:990–5.
- [3] Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol* 2013;31:594–605.
- [4] Habibovic P, Juhl M V, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, et al. Comparison of two carbonated apatite ceramics in vivo. *Acta Biomater* 2010;6:2219–26.
- [5] Barradas AMC, Monticone V, Hulsman M, Danoux C, Fernandes H, Tahmasebi Birgani Z, et al. Molecular mechanisms of biomaterial-driven osteogenic differentiation in human mesenchymal stromal cells. *Integr Biol (Camb)* 2013;5:920–31.
- [6] Johnson K. et al. , 2003: Linked deficiencies in extracellular PPI and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression , *J. Bone Miner. Res.* 18:994-1004

---

### 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?

In this project, we will test two types of CaP ceramics, with known bone regenerative potential: hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (TCP), without or loaded with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (hMSCs). The materials will be implanted subcutaneously in mice with the final aim to determine the role of Ectonucleotide Pyrophosphatase 1 (ENPP1) in material-induced bone formation.

The aim of the first and second part of the study is to investigate the importance of this differential expression by endogenous murine cells and cultured hMSCs, respectively. To obtain further insight in the mechanism of bone formation, ENPP1 will be suppressed in hMSC's by using shRNA inserted in pLK0.1 and shRNA scramble (control) to isolate the role of this protein in materials-induced bone formation.

---

### 3.3 Relevance

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

The aim of regenerative medicine approaches is to stimulate the self-regenerative potential of the body. In this way, regenerative strategies are used to restore damaged or diseased organ or tissue and regain normal function by exploiting the natural regenerative capacity of the body, instead of passively taking over the function by permanent implants. The role of synthetic materials in regenerative strategies has grown tremendously in the past decades, considering an increasing need for readily available and affordable solutions for our ageing populations. Osteoinductive biomaterials we are investigating here are an excellent example of the synthetic biomaterials for regenerative medicine strategies. They are fully synthetic, and therefore not associated with stability issues, and they can be produced in large quantities against relatively low cost, forming an attractive alternative to patient's own tissue. Upon implantation in clinically relevant challenging bone defects, these materials instruct the cells from the surrounding to differentiate towards the osteogenic lineage and form new bone. This has been demonstrated *in vivo*, however, the exact mechanism has not been described yet, despite work of a number of research groups around the world. The unique combination of a family of synthetic biomaterials with already demonstrated osteoinductive potential that no other research group possesses, with the high-end protein analyses and production equipment provides all the relevant ingredients to answer the question of the mechanism behind osteoinduction by biomaterials, and role of individual material properties in this mechanism. In summary, the innovative elements of this proposal lie in a unique combination of, on the one hand, instructive synthetic biomaterials for bone regeneration and access to and experience with hMSCs, and on the other, advanced protein analysis and production techniques.

---

### 3.4 Research strategy

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

The overall aim of this project is to unravel biological mechanisms governing osteoinduction by CaP ceramics, to be able to eventually develop new improved bone graft substitutes. To this end, we are working with a family of CaP ceramics with known osteoinductive potential *in vivo*. So far, we have performed extensive studies *in vitro*, based on culture of hMSCs on these materials. Specifically, the following steps will be undertaken:

- 1) HA and TCP (without cells) will be implanted subcutaneously in FVB mice. FVB mouse strain was previously shown to facilitate ectopic bone formation induced by CaP ceramics, in contrast to a range of other strains [1]. This condition is: to monitor protein expression in host-derived cells attracted into the materials when implanted without cells and subsequently evaluate the bone formation.
- 2) CaP's without cells are not able to promote ectopic bone formation in nude mice. While combining these materials with cells or growth factor have shown to initiate bone formation. HA and TCP loaded with hMSC will be implanted subcutaneously in immunodeficient (nude) mice. We have performed an extensive number of experiments culturing hMSCs in vitro on the ceramic materials, the results have shown high ENPP1 expression on TCP compares to HA. This condition is: to monitor the differences between HA and TCP, in terms of protein expression and eventually bone formation capacity [2].
- 3) Based on our in vitro studies ENPP1 expression has shown to be higher on TCP compare to HA. Conducting infection on hMSC while cultured on TCP (knockdown ENPP1) will enable us to stress the differences between the two conditions, more clearly. hMSC infected with shRNA-ENPP1 (treatment group), shRNA-scramble (control group), TCP loaded with hMSC and TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice to further determine the role of ENPP1 in materials-induced bone formation.

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.

#### **A. Improving CaP physico-chemical properties to induce bone formation (sub-goal 1)**

The *in vivo* studies we are requesting approval for will provide the insight regarding the role of the proteins, in particular those that were shown relevant for the *in vitro* osteogenic differentiation, in the process of true bone formation. This information can then be linked to the specific property or set of properties of the CaP ceramics. By doing so, and by understanding the mechanisms of the interactions between cells and the materials, we will be able to design and improve CaPs for treating large bone defect.

To achieve this aim, HA and TCP will be subcutaneously implanted in FVB mice for a maximum of 10 weeks in order to monitor the initiation and the development of bone mineral(3). In addition, HA and TCP, loaded with hMSCs, cultured on the materials for 2 days (*in vitro*) will be implanted in nude mice for a maximum of 10 weeks, The particles, sized 2-3 mm (30 mg), will be inserted into subcutaneous pockets at the back of the mice by creating a a surgical incision, under anesthesia, smaller than 1 cm. Upon explantation, the samples will be evaluated using histology and histomorphometry, to determine the quality and the amount of newly formed bone. Furthermore, qPCR, Western blot and immunohistochemical analyses will be performed to analyse the (spatial) expression of relevant markers of osteogenic differentiation at mRNA and protein levels.

#### **B. Understanding the role of ENPP1 in bone regeneration and entitling it as a reliable osteogenic marker (sub-goal 2&3)**

ENPP1 influences bone formation. Based on our *in vitro* results where ENPP1 expression in hMSCs was knocked down and cultured on TCP ceramic, it was observed that this positively affects the expression of BMP2, which is a known osteogenic marker. In the proposed study, the role of ENPP1 will be evaluated in bone regeneration by subcutaneously implanting constructs consisting of TCP and hMSCs with ENPP1 knocked-down in nude mice. For knocking down ENPP1, hMSCs will be infected with viral particles (pLKO.1) produced in 293T cells. The infected cells will be cultured on TCP particles for 2 days *in vitro* then implanted in mice for a maximum of 10 weeks. It is hypothesized that there will be a significant difference in the extent of osteogenic differentiation and ectopic bone formation between the constructs with hMSC-scrambled (control) and hMSC-shRNA (ENPP1). The constructs will be inserted into subcutaneous pockets at the back of the mice by creating a a surgical incision, under anaesthesia, smaller than 1 cm. Upon explantation, the samples will be evaluated using histology and histomorphometry, to determine the quality and the amount of newly formed bone. Furthermore, qPCR, Western blot and immunohistochemical analyses will be performed to analyse the (spatial) expression of



relevant markers of osteogenic differentiation at mRNA and protein levels.

References:

- [1] Barradas AMC, Yuan H, van der Stok J, Le Quang B, Fernandes H, Chaterjea A, et al. The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice. *Biomaterials* 2012;33:5696–705.
- [2] Muraglia A, Martin I, Cancedda R, Quarto R. A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions. *Bone* 1998;22:131–4.
- [3] Corre P, Merceron C, Vignes C, Sourice S, Masson M, Durand N, et al. Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: An “all-in-one” study in nude mice. *PLoS One* 2013;8:1–13.

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.

**Conditions A and B are parallel experiments, their outcomes will not affect each other. However, conduction condition C is dependent on the outcome of conditions B; In case of no differences between HA and TCP, in terms of ENPP1 expression and other osteogenic markers, condition C will not be executed.** To coherence between the two parts (A and B described above) of the study is that in both cases, we will investigate the process of ectopic bone formation, which is the ultimate *in vivo* proof of osteoinduction by CaP ceramics. In both cases the interest is in determining the molecular mechanisms behind the process of osteoinduction by determining the expression of markers of osteogenic differentiation, including ENPP1, which we have earlier selected as potential predictive marker of osteoinduction by biomaterials. The difference between the two studies lies in the fact that in the first study, we study the process of bone formation by the endogenous mouse cells and by implanted hMSCs, focusing on the extent of new bone formation and the expression of osteogenic markers including ENPP1, whereas in the second study, we zoom in on this marker to better understand the mechanism behind osteoinduction by biomaterials.

The milestones of the first study are:

- Confirming the difference in osteoinductive capacity between HA and TCP by demonstrating the difference in incidence and the amount of newly formed bone both induced by the materials alone in FVB mice and by materials loaded with hMSCs in nude mice;
- Demonstrating that the difference in osteoinductive capacity is due to differences in the expression of markers of osteogenesis, including BMP2, OP, OC;
- Demonstrating that ENPP1 is solely or in higher amounts expressed on TCP as compared to HA;
- Demonstrating that the expression of ENPP1 on TCP is limited to the surface of the material, i.e. locations where bone formation is initiated.

The milestones of the second study are:

- Confirming that ectopic bone formation in nude mice occurs upon implantation of TCP particles loaded with untreated hMSCs, in contrast to the control without the cells;
- Demonstrating the difference in osteoinductive capacity in terms of incidence and the amount of bone formation between TCP loaded with hMSC treated with shRNA-scramble (control) and with hMSCs treated with shRNA-ENPP1.
- Demonstrating that the difference in osteoinductive capacity between TCP loaded with hMSC treated with shRNA-scramble (control) and with hMSCs treated with shRNA-ENPP1 is due to differences in the expression of markers of osteogenesis, including BMP2, OP, OC.

Considering that the two studies are not interdependent, they will be performed simultaneously.

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	FVB mice (subcutaneous implantation) Nude mice (subcutaneous implantation)
2	
3	
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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Subcutaneous implantation in FVB and nude mice

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

The aim of this study is twofold: **1)** to assess the osteoinductive potential of different calcium phosphate (CaP) ceramics and to correlate this potential to the expression of markers of osteogenesis *in vivo* and to the physico-chemical properties of the ceramics and **2)**, to investigate the role of a newly-uncovered protein, ENPP1, in the process of materials-induced osteoinduction, both resulting from the endogenous mouse cells, and from human mesenchymal stromal cells (hMSCs). *In vitro* studies have been performed to determine the best conditions and to select the biological factors to be investigated *in vivo*.

The general outline of an experiment is as follows:

In this animal study, we have chosen for two time points of implantations: 1-week and maximum of 10-weeks.

In our *in vitro* studies, we have chosen for 1-week time point to monitor the expression of classical osteogenic markers and ENPP1 of the cells cultured on the CaPs, for this reason, and in order to relate the *in vitro* study to *in vivo* study, we included this time point.

Based on published studies the osteoinductive materials are expected to induce bone formation between 6-and 12-weeks of implantations (1)(8). We have chosen for a maximum of a 10-weeks to evaluate bone formation on different implants.

**1)** The two selected CaP ceramics, hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) will be implanted subcutaneously on the back of FVB mice. Similarly, HA and TCP, loaded with hMSCs cultured on the materials will be subcutaneously implated in nude mice. The implantation site will be prepared by

creating a blunt incision on the back of each mouse and inserting the implants into the subcutaneous pockets, followed by the closer of the incision. A maximum of 4 implants will be inserted in separate pockets in each animal. The size of the implants is approximately 2-3 mm (30 mg), and the samples are not expected to enlarge during the implantation time. Considering the relatively small size of the implants, no cross-talk or influences among the conditions are expected. The implants will remain in the animal for the duration of the experiment, for a maximum of 8 weeks. Using two different CaP ceramics, with different bone regenerative capacity will enable us to understand the response of the host tissue to different materials in terms of gene and protein expression that are related to osteogenesis.

**2)** One of the two ceramics described under 1, TCP, which has been shown previously to have a high bone regenerative potential, will be seeded with **a)** hMSC, treated with ENPP1-scramble (control), **b)** hMSC treated with shRNA (ENPP1), **c)** TCP loaded with hMSC untreated and **d)** TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice. Using established and previously published methods, these ceramic-cell constructs will be implanted subcutaneously on the back of nude mice using the procedure as described above under 1. The implantation site will be prepared by creating a blunt incision on the back of each mouse and inserting the implant into the subcutaneous pocket, followed by the closer of the incision. A maximum of 4 implants will be inserted in separate pockets in each. The size of the implants is approximately 2-3 mm, and this size is not expected to enlarging during the implantation time. Considering the relatively small size of the implants, no cross-talk among the conditions is expected. The implants will remain in the animal for the duration of the experiment, for a maximum of 8 weeks, which has been shown previously the optimal time point to study the materials-induced ectopic bone formation [3]. This study will enable the understanding of the role of ENPP1 in materials-induced ectopic bone formation, which will in turn guide the development of improved bone graft substitutes.

Following explantation, the samples from both 1 and 2 above will be analysed using qPCR for gene analysis (4), Western blotting for protein analysis (5), and immunohistochemistry to understand the spatial distribution of cells and proteins and histology and histomorphometry to determine the quality and the amount of newly formed tissue (6).

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

The proposed experiments for both study 1 and study 2 will consist of the procedures below.

Prior to the surgery, anesthesia and pre-operative pain relief will be administered to minimize the pain that may be induced by the creation of the implantation pockets. Per mouse 4 pockets will be created on the back by blunt dissection with the maximal distance between them. The ceramics will be placed in the pockets using a randomized scheme. Tissue layers will be sutured to retain the implants at the location of the implantation.

Implants, with some surrounding tissue will be removed from euthanized animals.

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

**Statistics:** The required number of animals per group is based on literature sources and several years of experience conducting similar experiments. Comparison between **1)** HA and TCP in FVB mice without the cells **2) HA and TCP loaded with hMSCs** in nude mice and **3) hMSC infected with shRNA-ENPP1** (treatment group), shRNA-scramble (control group), TCP loaded with hMSC and TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice the analysis will be performed using the following techniques: **qPCR** for genetic analysis, **Western blot** for protein expression, **histology and histomorphometry** for tissue formation and **immunohistochemistry** for spatial expression of the selected proteins. Implanting multiple implants per animal will reduce the number of animals without leading to more discomfort to the animals. Animal sampling has been obtained by the statistical software GPower, considering statistical test, power analysis, and effect size.

Sample sizes were estimated with an a priori ANOVA calculation (G\*Power). Based on our *in vitro* data, an effect of 2 ( $\beta=0.8$ ,  $\alpha=0.05$ ) based on our Western blot results, was calculated. A similar *in viv*

model has reported at effect size of 0,7 [1]. For comparison, standard effect sizes within orthopaedic research are 0.38-0.58, 95% CI [2]. Based on this and our *in vitro* data, an effect size of 1.5 was chosen.

## B. The animals

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

**Species and life stage:** For the study FVB and nude mice will be used. These mice will be obtained from a commercial licensed breeder.

**Mice gender:** It has been shown that hormones have roles in bone growth (7) and to limit the influence of hormones during bone formation and to prevent diversity in the results we choose male mice.

Justification:

**FVB mice:** have shown to be able to form bone upon subcutaneous implantation of osteoinductive CaPs[1]. To investigate the early event leading to ectopic bone formation.

**Nude mice:** will be used due to their immunodeficient state, which makes it possible to implant hMSC – ceramic constructs. Such constructs in nude mice have previously been shown to lead to ectopic bone formation.

### Maximum number of animals required:

**Note: Based on our statistical calculation we need 4.5 mice per time point/material. However, the number of mice is rounded to 5 for each time point/material. As results, for two materials we need 10 mice per time point.**

Condition **1**): HA and TCP without cells will be implanted in FVB mice separately. 1 mouse has 2 pockets so  $n=1$  for each conditions, and based on our calculation 10 mice are required for comparing HA and TCP with  $n=10$  for 1 time point with 1 technique. However, using 2 techniques and 2x time points =  $10 \times 2 \times 2 = 40$  (FVB mice) in total.

Condition **2**): HA and TCP seeded with hMSC will be implanted in nude mice separately. 1 mouse has 2 pockets so  $n=1$  for two conditions, and based on our calculation 10 mice are required for comparing HA and TCP with  $n=10$  for 1 time point with 1 technique. However, using 2 techniques and 2x time points =  $10 \times 2 \times 2 = 40$  (**nude mice**) in total.

Condition **3**): hMSC infected with shRNA-ENPP1 (treatment group), shRNA-scramble (control group), TCP loaded with hMSC and TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice. 1 mouse has 4 pockets so  $n=4$  for 4 conditions, and based on our calculation 5 mice are required for comparing the conditions with  $n=10$  for 1 time point with 1 technique. However, using 2 techniques and 2x time points =  $5 \times 4 \times 2 = 40$  (**nude mice**) in total.

Total mice needed:

FVB: 40

Nude: 80

### References:

- [1] Barradas AMC, Yuan H, van der Stok J, Le Quang B, Fernandes H, Chaterjea A, et al. The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice. *Biomaterials* 2012;33:5696–705.
- [2] Vavken, P., et al., The use of confidence intervals in reporting orthopaedic research findings. *Clin Orthop Relat Res*, 2009. 467(12): p. 3334-9.
- [3] Ng AMH, Tan KK, Phang MY, Aziyati O, Tan GH, Isa MR, et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:301–12.
- [4] Yang J-H, Kim H-J, Kim S-E, Yun Y-P, Bae J-H, Kim S-J, et al. The effect of bone morphogenic protein-2-coated tri-calcium phosphate/hydroxyapatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis. *Cytotherapy* 2012;14:315–26.
- [5] Lau WM, Doucet M, Stadel R, Huang D, Weber KL, Kominsky SL. Enpp1: A Potential Facilitator of Breast Cancer Bone Metastasis. *PLoS One* 2013;8:1–5.

[6] Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hale MB, Hitzman C, Borowsky AD, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med* 2014;20:436–42.

[7] Jr GBC. The Role of Estrogen in Bone Growth and Maturation During Childhood and Adolescence 1997;61:141–4.

[8] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med* 2011;15:718–46.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

**Replacement:** In this research line, we have worked for four years on *in vitro* experiments to optimize The pre-selected biomaterials and markers, as well as biochemical analyses. Nevertheless, to understand and validate the mechanism of how the cells response to different materials in the process leading to bone formation, and to be able to translate our findings to improved materials, this *in vivo* study is required.

**Reduction:** A statistical analysis was completed to reduce the number of animals while still gaining maximum information/data. In addition, each animal has four sites, reducing the number of animals used.

#### Refinement:

We used a unique approach (mass spectrometry) to identify proteins that might have significant role in bone formation in hMSC cultured on different CaPs. This approach has enabled us to design and perform the in the vivo studies more in refinement way and helped us to focus on proteins that involved in osteogenic process.

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

Before any surgical procedure the mice will be administrated with preoperative pain relief. The discomfort is estimated as mild. The surgical procedure will be performed under full anaesthesia of the animals. The animals will also receive pain relief post-operatively. The animals will be monitored daily by experienced staff. No adverse effects on the environment are expected. When using nude mice, it is essential to use antibiotics post surgery. All animals will be monitored daily. In case of infection or severe side-effects, the animal will be immediately and humanely euthanized.

### 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.

## 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

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.

All operations will be performed under aseptic conditions, anaesthesia and post-operative analgesia with usage of antibiotics (when using nude mice). **Analgesia** will be administered for at least 2 days following surgical procedures.

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

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

Nude mice are immunodeficiency mice and they are extremely vulnerable for infections and related disease. If any side effect or infections are occurred, the animals will be euthanized.

Explain why these effects may emerge.

**Nude mice:** implantation of CaPs subcutaneously may cause pain and infection during and after surgical procedure. Therefore, injecting adequate pain relief, see section H.

**FVB mice:** implantation of CaPs subcutaneously may cause pain and during and after surgical procedure. Therefore, injecting adequate pain relief, see section H.

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

Monitoring of the animals will take place daily by experience technician. **The implants are placed under aseptic conditions**. Antibiotics are used to prevent infection, and adequate pain relief delivered to reduce the pain.

### 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.

- Infections as a result of surgical procedures.
- Mice showing abnormal behaviour and being unable to adjust to the captive environment will immediately be euthanized.
- Weight reduction >15% in the first two days or > 20% with regard to the starting weight.
- Graft rejection by the host

Indicate the likely incidence.

Based on our previous experience, the likelihood of having an accident mentioned above is considered low.

#### **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').

Placing mice under anaesthesia: **mild discomfort**

The implantation of screening devices: **mild discomfort**

Post-surgery: **mild discomfort**

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order to explant the implants, the animals will be sacrificed at the end of the experiments.

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

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

Yes



# DEC-advies PV 2016-018/ [REDACTED]

---

## Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice.*
3. **Titel van de NTS:** *Onderzoek naar de rol van calciumfosfaat in botregeneratie.*
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
  - naam DEC: *DEC-UM*
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl](mailto:secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl)
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC; 15-02-2017
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken; 24-02-2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

*De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.*
8. **Eventueel horen van aanvrager: N.V.T.**
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - Datum; 02-03-2017

## **Gestelde vragen en antwoorden:**

### 3 Algemene projectbeschrijving

**Vraag:**

1. U geeft aan dat U het belang wilt onderzoeken van endogene cellen afkomstig van muizen. Waarom past U niet mesenchymale stamcellen van muizen al dan niet voorzien van ENPP1 suppressie via smRNA dan wel smRNA scramble toe? Het voordeel zou kunnen zijn dat gebruik gemaakt kan worden van immuuncompetente muizen.

**Antwoord:**

All our preclinical *in vitro* experiments were performed using clinically relevant human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. This is why we choose to use these cell in the *in vivo* experiments as well. Furthermore, we have performed some preliminary experiments with murine cells, and culture on HA and TCP did not show as pronounced differences in ENPP1 expression as did human cells, which is another reason to choose human cells for these experiments.

**3.3. Belang**

**Vraag:**

1. U geeft aan dat vooral ouderen baat zullen hebben bij verbeterde bot-regenererende materialen. De DEC-UM vraagt zich af of mesenchymale stamcellen in alle leeftijden even goed aanslaan? Wat is Uw visie op de invloed van leeftijd op het succes van de regeneratieve vermogens van de materialen + mesenchymale stamcellen die U wilt gaan gebruiken?

**Antwoord:**

Previous research has shown that aging may reduce the proliferation and differentiation potential of adult stem cells, however, other factors, including genetic factors play a role too.. The approach we are testing with this study is specifically designed to attract and induce the endogenous stem cells of the patient to differentiate into the osteogenic lineage and form new bone, to enhance the self-regenerative potential of the body. The need for enhanced regeneration is relevant for patients of all ages, as trauma, spinal fusion or tumour removal are not exclusively age-related treatments. Nevertheless, as we age, the incidence of such clinical conditions may increase.

**3.4.3**

**Vraag:**

1. U gaat in onderdeel A kijken naar de expressie van verschillende botmarkers. Vervolgens heeft U er al voor gekozen om in onderdeel B te gaan kijken naar de marker ENPP1. Bestaat er een kans dat U ook andere markers gaat vinden in onderdeel A die U dan vervolgens mee zou willen nemen in onderdeel B? Wilt U dit niet meteen al meenemen in deze aanvraag? (In dat geval is er wel een go-no go punt tussen onderdeel A en B?)

**Antwoord:**

In section A, only ceramic materials, without cells will be implanted. In addition to analysing markers of osteogenic differentiation, we will also investigate the ability of the materials to induce new bone formation in the absence of implanted cells, i.e. their intrinsic osteoinductive potential. Part B, where the cells will be implanted, is more specifically focused on understanding the role of ENPP1 *in vivo*. Furthermore, the two parts use different mouse strains, showing that the two studies are related, but not dependent on one another, and therefore no go-no go decision is needed/can be taken. Nevertheless, the design of part B study also allows for the analysis of other osteogenic markers, co-expressed with ENPP1.

### **3.4.4**

#### **Appendix 1**

##### **Algemene opmerking:**

1. Zijn 4 pockets in 1 muis inderdaad  $n=4$ ? Normaal wordt het dubbel implanteren van een implantaat met dezelfde eigenschappen in 1 dier gezien als een duplicaat, niet als een  $n=2$ . Kunt u toelichten waar uw keuze op gebaseerd is?

##### **Reactie:**

The sample numbers have been adjusted!

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

##### **Vraag:**

1. Welke analyse verricht met een Western blot gebruikt U als uitleesparameter teneinde de groepsgroottes te bepalen in de power analyse? Ligt toepassing van uitleesparameters vanuit de qPCR niet meer voor de hand daar de VC in deze analyse geringer lijkt?

##### **Antwoord:**

Generally, the results of Western blot analyses are considered more predictive for the in vivo outcome in this type of research, which is these results were selected to calculate the sample size.

##### **Vraag:**

2. U geeft in het eerste gedeelte aan dat de dieren maximaal 10 weken met implantaat zullen zijn. Echter onder 1) en 2) spreekt U over een maximum van 8 weken. Kunt U dit uitleggen?

##### **Antwoord:**

This is indeed a mistake in the test. The correct maximal implantation time should be 10 weeks for all sections.

#### **B. De Dieren.**

##### **Vraag:**

3. Uw reden om alleen mannen te gebruiken is de rol van hormonen op botgroei. Hebben mannen ook vaker implantaten nodig dan vrouwen? Zou het niet juist interessant zijn om te weten wat de verschillen tussen mannen en vrouwen zijn om zo een idee te krijgen over hoe de materialen uiteindelijk in de kliniek aan zullen slaan bij zowel mannen als vrouwen?

##### **Antwoord:**

The is indeed a valid reason to use both male and female animals. Nevertheless, at this stage of research, that is focused on more fundamental understanding of the role of materials and specific proteins in materials-induced bone formation, it is important to exclude other factors, such as hormonal interference. At a later stage of research, the gender effect on the treatment would indeed be an interesting research question.

#### **F. Huisvesting en verzorging.**

##### **Vraag:**

4. Is er kans dat de muizen aan elkaars wondjes gaan bijten?

##### **Antwoord:**

Based on our previous experience with similar type of implantations in mice, the chance of mice biting/opening the wounds of other mice is limited.

Nevertheless, following the surgery, the mice will be monitored on a daily basis, and in case this happens, precautions will be taken in agreements with animal care personnel.

## **H. Pijn en pijnbestrijding.**

### **Vraag:**

5. Bestaat er een mogelijkheid dat de pijnstilling de expressie van botmarkers zal beïnvloeden? En antibiotica (genoemd onder I)?

### **Antwoord:**

To the best of our knowledge, there is no evidence that the pain killers or antibiotics influence the extent of bone formation or the expression of the markers of osteogenesis (in contrast, for example to some NSAID's). Nevertheless, even if there is an effect that we are not aware of, it will similarly influence the control groups and the study groups, and therefore a comparison can still be made.

## **J. Humane eindpunten.**

### **Vraag:**

6. Wat bedoelt U met “unable to adjust to the captive environment”?

### **Antwoord:**

This means abnormal behaviour, including spinning, being very quiet, weight loss, as a result being within a cage for a period of maximal 10 weeks.

### **Vraag:**

7. Wat is een waarschijnlijkheid ‘laag’?

### **Antwoord:**

These are general symptoms that might occur after any surgery. However, based on our previous in vivo studies none of these symptoms have been reported.

- Datum antwoord; 23-03-2017
- Verstrekte antwoorden; zie hierboven
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## **10. Eventuele adviezen door experts: *N.V.T.***

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

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **JA**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

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

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren.*

*De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

*Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

*Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.*

*Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

*Het directe doel van het project is het bepalen van de rol van Ectonucleotine Pyrophosphatase 1 (ENPP1) bij botvorming, met behulp van 2 typen keramische implantaten die erkend regeneratief potentieel hebben bij botten, en die al dan niet geladen zijn met uit menselijk beenmerg gewonnen mesenchymale stromale cellen (hMSCs).*

*Het uiteindelijke doel is het maken van betere botssubstituten gebaseerd op het stimuleren van het zelf-regeneratieve potentieel van het lichaam.*

*Het betreft hier een fundamenteel project.*

*Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat er belangrijke stappen richting het uiteindelijke doel gezet kunnen worden binnen de duur van dit project.*

*De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.*

*Uit de aanvraag blijkt er dat er behoefte bestaat aan betrouwbare behandelingsmethoden bij grote botdefecten die veroorzaakt worden door bijvoorbeeld trauma, of verwijdering van tumoren. Hoewel de beste optie voor het behandelen van dergelijke defecten nog steeds patiënt-eigen bot (autograft) is, brengt deze methode veel nadelen met zich mee zoals verhoogde kans op infecties en langere operatietijd. Daarom is er een toenemende vraag is naar veilige en goedkope alternatieven.*

*De DEC-UM is derhalve van mening dat het directe doel, het bepalen van de rol van Ectonucleotine Pyrophosphatase 1 (ENPP1) bij botvorming, met behulp van 2 typen keramische implantaten die erkend regeneratief potentieel hebben bij botten, en die al dan niet geladen zijn met uit hMSCs, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op het verkrijgen van wetenschappelijke kennis over de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan botgroei en botregeneratie, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de medische wetenschap.*

*Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen licht ongerief ondervinden.*

*Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen over mechanismen die van belang zijn bij het stimuleren van botregeneratie.*

*Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Hoewel dit project fundamenteel wetenschappelijk van aard is, kunnen positieve resultaten de weg wijzen naar de ontwikkeling van klinisch relevante behandelingsmethoden voor botdefecten.*

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

*Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan.*

*De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.*

*Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe.

**N.V.T.**

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.*

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de offering aan het eind van de proef.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

*Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.*

*3V's*

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.

*De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.*

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe.

*De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

*Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.*

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).

*De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

*Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.V.T.**

*NTS*

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

*Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.*



## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol van ENPP1 bij botvorming om uiteindelijk betere botssubstituten te kunnen maken, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice*"?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *licht nadeel*.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *reëel voordeel*.

Algemeen: *relevante groei van medische kennis*.

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de onderzoekers en de medische wetenschap binnen het project "*The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice*" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na licht ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter bijdragen aan kennis over het stimuleren van botregeneratie. Deze kennis is van belang voor de ontwikkeling van nieuwe, veilige en betaalbare, methoden voor de behandeling van botdefecten.

Er is ook behoefte aan dergelijke therapieën als alternatief voor methoden met patiënt-eigen lichaamsmateriaal.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van reëel belang.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol van ENPP1 bij botvorming om uiteindelijk betere botssubstituten te kunnen maken, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice*"? bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.

De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1070020171684

**Bijlagen**

2

Datum 10 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 mei 2017. Het gaat om uw project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020171684. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

10 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1070020171684

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



**Datum:**  
10 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171684

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

E-mailadres: ivd-secretariaat-cpv@maastrichtuniversity.nl

**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: 15 april 2017  
Geplande einddatum: 15 april 2020  
Titel project: The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de rol van calciumfosfaat in botregeneratie  
Naam DEC: DEC UM  
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht  
E-mailadres DEC: secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-  
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: Maastricht  
Datum: 9 mei 2017

**Datum:**  
10 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171684



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

[Redacted]

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1070020171684  
**Bijlagen**  
1

Datum 12 juni 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 9 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice" met aanvraagnummer AVD1070020171684. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 juni 2017 tot en met 15 april 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
12 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171684

### **Bezwaar**

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

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

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

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

### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



**H. G. de Peuter**  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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





# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht  
Adres: Postbus 616  
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT  
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 juni 2017 tot en met 15 april 2020, voor het project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice" met aanvraagnummer AVD1070020171684, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 mei 2017, ontvangen op 9 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Subcutaneous implantation in FVB and nude mice</b>				
	Muizen (Mus musculus) / n=40 FVB & n=80 nude muizen	120	100% Licht	

### Voorwaarden

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

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

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171684

het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**  
AVD1070020171684

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD1070020171684

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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