

	Inventaris Wob-verzoek W17-12								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20171924	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min):

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="0"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Grooteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, [redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10	Postbus	9101, [redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10																
Postbus	9101, [redacted]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[redacted]</td> <td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>wetenschappelijk onderzoeker</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	wetenschappelijk onderzoeker		Afdeling	[redacted]		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	wetenschappelijk onderzoeker																
Afdeling	[redacted]																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td>☐ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 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

Instantievoor Dierenwelzijn

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☒ Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag

☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum

0 1 . 0 7 . 2 0 1 7

Einddatum

3 0 . 0 6 . 2 0 2 2

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC

RU DEC

Postadres

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541,00 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
☐ Via een eenmalige incasso
☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Naam [REDACTED]

Functie Instantie voor dierenwelzijn

Plaats Nijmegen

Datum 30 - 05 - 2017

Handtekening

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☒ Translational or applied research ☐ Regulatory use of routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ 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.

Gewrichtskraakbeen is een weefsel dat bestaat uit een relatief gering aantal cellen die zijn omgeven door zelfgemaakte moleculen die in staat zijn de grote krachten te verwerken die dit weefsel moet opvangen. Er lopen geen bloedvaten of zenuwen door dit weefsel en beschadigingen kunnen niet worden gerepareerd door de chondrocyt (kraakbeencel) . Ook aanbrengen van chondrocyten of stukjes kraakbeen in de beschadiging leidt niet tot een duurzaam herstel (Falah, 2010). Bij de ziekte osteoartrose is kraakbeenschade een groot probleem. Dit leidt tot functieverlies en veel pijn bij de patiënten. Kraakbeen kan tot niet worden gerepareerd en er is geen therapie die de ziekte stopt of vertraagt, zodat uiteindelijk een totale gewrichtsvervanging de enige oplossing is.

De laatste jaren is de hoop gevestigd op kraakbeen reparatie door stamcellen. Deze cellen kunnen in het laboratorium in aanwezigheid van de juiste groeifactoren aangezet worden tot vorming van kraakbeen. In de kliniek heeft het aanbieden van stamcellen of het boren van gaatjes in het aangedane gebied om stamcellen vanuit het beenmerg toegang te verschaffen tot nu toe geen duurzaam kraakbeenherstel opgeleverd (Scotti, 2016). Onze groep heeft aangetoond dat stoffen in het zieke gewricht de chondrogene differentiatie, de uitrijping van stamcellen tot chondrocyten, remmen (Heldens, 2012). Tissue engineering op basis van stamcellen zou waarschijnlijk veel beter verlopen als we de blokkerende stoffen die het zieke gewricht maakt kunnen remmen. We hebben al gevonden dat de meest voor de hand liggende stoffen interleukine-1 (IL-1) en tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) niet de boosdoeners zijn (Heldens, 2012) . Om dit te onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van een eenvoudig in vitro model. Hiervoor werden humane mesenchymale stamcellen als pellets (compacte bolletjes) gekweekt in medium met de juiste groeifactoren voor uitrijping tot kraakbeen, waarbij met name transforming growth factor beta (TGF-b) van belang is voor de juiste differentiatie. Vroeg in dit proces werd medium toegevoegd waarin synovium (binnenste laag van het gewrichtskapsel) uit osteoartrotische gewrichten gedurende 24 uur was gekweekt. Door de stoffen die het synovium daarin had uitgescheiden, werd de kraakbeenvorming geremd en dit hebben we gebruikt als een in vitro model voor belemmering van kraakbeenherstel in een ziek gewricht. We weten niet welke stoffen uit het gewricht verantwoordelijk zijn voor belemmering van kraakbeenherstel. IL1 en TNFa zijn het niet en dan zou je nog honderden minder voor de hand liggende eiwitten moeten gaan

testen op hun betrokkenheid. Daarom hebben we gebruik gemaakt van proteïne kinase remmers, die signaleringsroutes in de cel blokkeren. Op deze wijze heeft onze groep al een paar van deze intracellulaire signaleringsroutes gevonden die betrokken zijn bij belemmering van kraakbeenvorming (van Beuningen, 2014). De bescherming van de chondrogene differentiatie door de remmers werd beoordeeld op basis van histologie en mate van depositie van proteoglycanen (kraakbeen-specifieke extracellulaire matrix molekulen) in de celpelleten. Remming van Janus kinases (JAKs) door tofacitinib (pan-JAK remmer) en van TGF- β -activated kinase (TAK) door oxozaenol bleek kraakbeenvorming te beschermen, en combinatie van deze remmers bleek nog effectiever. Om het belang van deze signaleringsroutes, en het effect van het remmen van deze routes op kraakbeenherstel, duidelijk te krijgen, hebben we een in vivo model nodig dat een goede reflectie geeft van de humane situatie. Ons lab is gespecialiseerd in het kniegewricht van de muis. Dat is zo klein dat eigenlijk alleen de patellaire groef benaderbaar is voor het maken van een kraakbeen defect. Deze techniek is de enige die is beschreven voor studies aan herstel van gewrichtskraakbeen in de muis (Fitzgerald, 2008 en Eltawil, 2009). We zijn in staat in de knie van de muis op een specifieke plaats reproduceerbaar een full-thickness defect te maken. Deze techniek houdt in dat we een gaatje maken in het gewrichtskraakbeen tot juist in het onderliggende bot. Doordat het defect tot in het onderliggende bot doorloopt, kunnen stamcellen vanuit het beenmerg het defect bereiken en hier nieuw kraakbeen produceren (in analogie met orthopedische procedures in humane gewrichten). Na de operatie kan het kraakbeenherstel worden bestudeerd. Ons lab heeft veel ervaring met histologische analyse van het kniegewricht van de muis.

Referenties:

Falah, M et al. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop* 34:621, 2010.

Scotti, C et al. Cartilage repair in the inflamed joint: considerations for biological augmentation toward tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B Rev*, 22:149-159, 2016.

Heldens, GTH et al. Catabolic factors in osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 18:45-54, 2012.

van Beuningen, HM et al. Inhibition of TAK1 and/or JAK can rescue impaired chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in osteoarthritis-like conditions. *Tissue Engineering Part A*, 20:2243-2252, 2014.

Fitzgerald, J et al. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16:1319-1326, 2008.

Eltawil, NM et al. A novel in vivo murine model of cartilage regeneration. Age and strain-dependent outcome after joint surface injury. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17:695-704, 2009.

3.2 Purpose

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

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

De hoofddoelstelling is het bevorderen van kraakbeenherstel door het remmen van nadelige intracellulaire signaalroutes in stamcellen in een geactiveerd gewricht. Die activering kan ontstaan door kraakbeenschade alleen, maar in patiënten is vaak sprake van kraakbeenschade in combinatie met osteoartrose, of kraakbeenschade in combinatie met ontsteking. De te gebruiken remmers, genoemd in paragraaf 3.1, zijn naar voren gekomen in het in vitro vooronderzoek waarin ze kraakbeenherstel verbeterden in aanwezigheid van stoffen uit het osteoartrotische gewricht.

Haalbaarheid

De operatie die nodig is om het gewrichtskraakbeen te kunnen bereiken en daarna de wond weer te sluiten is gelijk aan de operatie voor het destabilisatie mediale meniscus (DMM) model (beschreven onder animal procedure 2) die door onze afdeling regelmatig wordt uitgevoerd. De vaardigheid in het reproduceerbaar aanbrengen van full-thickness defecten op een specifieke plaats in het gewrichtskraakbeen is elders geleerd en op het eigen CDL geoptimaliseerd. Histologie van 4 of 8 weken na de operatie diende als controle op de technische uitvoering en liet tevens zien dat de operatie activatie van het gewricht veroorzaakt (geringe osteophyt vorming). Op de afdeling experimentele reumatologie is veel expertise op het gebied van muismodellen voor artritis en artrose. Ook is veel ervaring met het maken en analyseren van histologische preparaten van de gewrichten van de muis. Alle bijbehorende vaardigheden worden routinematig uitgevoerd, wat de haalbaarheid van dit project ten goede komt. Het aantal remmers dat we willen testen is vooralsnog beperkt. Nieuwe kandidaten zullen niet in hoog tempo opdoemen. Ook gezien de lange duur van de experimenten zal het aantal te testen remmers of remmer-combinaties niet meer dan 5 per jaar zijn.

3.3 Relevance

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

De wetenschappelijke vraag die ten grondslag ligt aan de voorafgaande in vitro experimenten is: welke intracellulaire signaal routes worden gebruikt door voor kraakbeenvorming nadelige stoffen uit het osteoartrotische (OA) gewricht? Verder onderzoek van die routes zou kunnen leiden tot identificatie van de verantwoordelijke stoffen. De dierexperimenten moeten aangeven of de geselecteerde signaal routes ook verantwoordelijk zijn voor slecht kraakbeenherstel in vivo.

Gewrichtskraakbeen is niet in staat zichzelf te repareren en chirurgische methoden om kraakbeen te repareren hebben tot nu gefaald. Ongevallen en sportblessures zijn de belangrijkste oorzaken van acute kraakbeenschade. Ook de ziekte osteoartrose (OA) leidt tot ernstige schade aan het gewrichtskraakbeen. Deze ziekte treft een groot deel van de bevolking. In het jaar 2011 leden in ons land 594.000 mensen aan OA van de knie en 359.000 mensen aan OA van de heup (bron: RIVM). De hoop is gevestigd op genezing van kraakbeenschade door stamcellen. Bij voorkeur zouden die stamcellen uit naburige weefsels worden gerekruteerd. De grote uitdaging is om kraakbeenherstel door stamcellen te realiseren in door schade of ziekte geactiveerde gewrichten. Niet alleen voor mensen, maar ook voor dieren is dit van groot belang (veterinair belang, paard, hond).

3.4 Research Strategy

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

Met behulp van ons in vitro systeem met stamcellen die worden aangezet tot kraakbeenvorming hebben we twee remmers van intracellulaire signaalroutes gevonden die kraakbeenvorming mogelijk maken ondanks de aanwezigheid van factoren uit het osteoartritis(OA) gewricht. Deze veelbelovende stoffen willen we nu ook in het kniegewricht van de muis testen op het bevorderen van kraakbeenherstel door stamcellen. Dit zal gedaan worden door stamcellen die vanuit het eigen beenmerg toestromen naar een aangebrachte kraakbeenschade. Omdat de remmers zijn gevonden in een OA omgeving gaan we in eerste instantie ook kijken naar herstel van aangebrachte schade binnen een model voor OA. In OA patiënten met kapot kraakbeen zal tissue engineering met behulp van stamcellen ook in een dergelijke omgeving moeten worden uitgevoerd. Als de te testen remmers ook in vivo kraakbeenherstel tegen een OA achtergrond blijken te bevorderen, zullen we kijken of ze ook werken in twee andere klinisch relevante situaties, nl een gewricht met alleen kraakbeenschade (trauma) en een gewricht met schade en ontsteking (artritis). In eerste instantie willen we de TAK1 remmer oxozaenol en de JAK remmer tofacitinib testen, afzonderlijk en in combinatie. De combinatie van beide remmers is tijdens de in vitro voorstudies (van Beuningen, 2014) namelijk nog effectiever gebleken dan de afzonderlijke remmers (additieve effecten). Omdat tofacitinib alle vier de JAKs remt (JAK1, JAK2, JAK3 en TYK2) zullen we ook specifieke JAK remmers testen, in de hoop dat de afzonderlijke JAKs een specifieke rol spelen in het doorgeven van gunstige of nadelige signalen. Als een van de specifieke JAK remmers gelijk aan of beter dan tofacitinib werkt zal deze ook in combinatie van de remmer van de TAK1 signaleringsroute getest worden om te zien of die combinatie extra effectief is. Om de genoemde kandidaten afzonderlijk en in besproken combinaties te testen zijn rond de tien experimenten nodig, alleen al binnen het OA model. Mogelijk komen in de nabije toekomst uit nieuwe kennis en eigen in vitro tests nog andere belangrijke signaleringsroutes naar voren die betrokken zijn bij de schadelijke inwerking van het OA gewricht op kraakbeen herstel. Experimenten zullen in eerste instantie worden uitgevoerd met een muizenstam die, net als de mens, geen spontaan herstel van kraakbeenschade laat zien. Een risico is dat onze in vitro voorscreening is gebaseerd op uitrijping van de stamcel, terwijl de niet herstellende muizenstam mogelijk op een eerder niveau faalt, zoals bij de recrutering van de stamcellen; we zagen immers in eerdere experimenten met C57Bl/6 muizen geen cellen binnenkomen in het kraakbeendefect. Daarom zullen we bij tegenvallende resultaten ook kijken of de proteïne kinase remmers herstel kunnen versnellen in een muizenstam die het kraakbeen wél spontaan herstelt, zoals de DBA1 of de MRL/MpJ (gebruikt in de eerder genoemde studies van Fitzgerald 2008 en van Eltawil 2009).

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.

Een kraakbeendefect (gaatje in het gewrichtskraakbeen tot in het subchondrale bot) zal worden aangebracht. Drie dagen na deze operatie zullen de muizen de beschermende stof toegediend krijgen via osmotische pompjes (eventueel kan dit ook via dagelijkse orale gavage, of via het drinkwater). Na 8 weken zullen de gewrichten uitgeprepareerd worden voor histologische analyse van het kraakbeenherstel. De geselecteerde remmers die in vitro chondrogene differentiatie verbeteren in OA condities, zullen in vivo eerst getest worden in muizen met kraakbeenschade in een OA model (DAP2). Alleen stoffen in die omstandigheden een gunstige werking tonen zullen ook worden getest in een gewricht met alleen kraakbeenschade (DAP1 staat model voor trauma) en in een gewricht met kraakbeenschade en ontsteking (DAP3 staat model voor schade binnen artritis).

Diermodellen

Kraakbeenrepair model (gebruikt in alle drie de animal procedures)

In dit model wordt met een naald een full-thickness defect (gaatje tot in het onderliggende bot) gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knieschijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt.

DMM model (destabilisatie van de mediale meniscus; alleen gebruikt in animal procedure 2)

In het DMM model wordt, na luxatie van de patella, het ligament waarmee de mediale meniscus met het bot van de knie verbonden is, doorgesneden onder narcose, met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. Hierna zal initieel schade optreden aan de mediale zijde van de knie en later ook aan de laterale zijde. Dit is een model voor osteoartrose (OA) na bandletsel in de mens. De operatie procedure van dit model komt sterk overeen met de operatie procedure van het kraakbeenrepair model. In beide gevallen moet de patella opzij worden geschoven om vervolgens nog een kleine handeling in het vrijgekomen gebied te verrichten. Hierdoor kunnen beide modellen binnen één operatie worden gerealiseerd (zoals beschreven in DAP2), zonder extra overlast voor het dier. Op deze wijze kunnen we herstel van kraakbeenschade bestuderen in een OA gewricht, want uiteindelijk willen we graag OA patiënten helpen.

Ontstekingsmodel (alleen gebruikt in animal procedure 3)

Schade aan het gewricht trekt ontstekingscellen aan. Dat betekent dat kraakbeenherstel ook belemmerd kan worden door ontstekingsfactoren. Daarom willen we kraakbeenherstel ook bestuderen tegen een lichte ontstekingsachtergrond. In dit model wordt een ontstekingsprikkel zoals zymosan geïnjecteerd in het kniegewricht .

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

De hoofddoelstelling is het bevorderen van kraakbeenherstel door het remmen van nadelige intracellulaire signaalroutes in een geactiveerd gewricht. Kandidaat-stoffen die naar voren zijn gekomen bij in vitro voor-screening zullen worden getest op hun invloed op kraakbeenherstel in muizen met een aangebrachte kraakbeenschade in de patellaire groef. Omdat de voor-screening is gedaan in aanwezigheid van stoffen uit het OA

gewricht zal herstel van kraakbeenschade door deze remmers eerst worden onderzocht binnen een model voor OA (DAP2). Remmers met een gunstige werking in OA condities zullen ook worden toegediend binnen een model voor trauma (DAP1) of binnen een model voor kraakbeenschade bij artritis (DAP3) om te zien of er een meer algemene werking is bij activatie van gewrichten (dus buiten de OA situatie). Een go/no go beslissing is er dus na een test van een remmer binnen DAP2. Daarnaast is in vitro gebleken dat remming van TAK1 en JAK (zie 3.4.1) tegelijkertijd effectiever is dan de afzonderlijke remmers. Combinatie van TAK1 en JAK remming zouden we nu ook in vivo willen toepassen. De go/no go beslissing is in dit geval dat we alleen combinaties gaan uitvoeren als de afzonderlijke TAK1 en JAK remmers een gunstige werking laten zien.

Lijst animal procedures:

1. Bevordering kraakbeenherstel mbv kinase remmers
2. Bevordering kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht
3. Bevordering kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht

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	Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers
2	Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht
3	Bevordering van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers

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.

Om herstel van gewrichtskraakbeen in vivo te kunnen bestuderen moet er op gestandaardiseerde wijze en op een standaard plaats een gaatje in het kraakbeen gemaakt worden. Kraakbeen in het kniegewricht van de muis is bijna niet te bereiken zonder grote schade aan de ondersteunende structuren. De plaats die het best te bereiken is, is de patellaire groef. Om toegang van mesenchymale stamcellen uit het eigen beenmerg mogelijk te maken zal het een door het kraakbeen heen in het onderliggende bot geprikt worden. Stoffen die in vitro positieve effecten op chondrogene differentiatie van stamcellen hebben zullen in dit model getest worden op hun in vivo werking. De kwaliteit van het kraakbeen op de plaats van de beschadiging zal na 8 weken histologisch worden bestudeerd aan de hand van sagittale doorsneden van het kniegewricht. Muizenstammen met spontane kraakbeenregeneratie laten na 8 weken gedeeltelijk herstel van de beschadiging zien, terwijl de C57Bl/6 muis, die wij gebruiken, dit niet kan repareren. In eerste instantie zullen wij de C57Bl/6 muis gebruiken omdat ook de mens nauwelijks kraakbeenregeneratie laat zien bij full-thickness defecten (tot in het bot). In een pilot experiment hebben wij gezien dat na 8 weken vrijwel geen cellen waren te vinden in het defect, dus is er een risico dat deze muizenstam niet in staat is om stamcellen naar het kraakbeendefect te brengen en dat is wel een voorwaarde voor onze experimenten. Als blijkt dat onze meest veelbelovende proteïne kinase remmers niet in staat zijn om kraakbeenregeneratie te induceren zullen we overstappen op MRL/MpJ muizen, die in staat zijn tot spontane kraakbeenregeneratie (eerder genoemde studie Fitzgerald, 2008), of DBA/1 muizen die dit in mindere mate kunnen (eerder genoemde studie Eltawil, 2009). In een dergelijke stam kunnen we dan uitzoeken of het herstel wordt versneld door de kinase remmers.

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

In dit model wordt met een naald een gaatje gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knieschijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt. In een klein eerste experiment hebben wij reeds gezien dat wij deze gaatjes reproduceerbaar kunnen aanbrengen zonder al te veel verstoring van het gewricht. Stoffen die in vitro chondrogenese bevorderen zullen worden toegediend via osmotische pompjes (onderhuids ingebracht), orale gavage 2x daags, gedurende 2 weken, of via het drinkwater. Om het gewricht na de operatie tot rust te laten komen (opruimen bloed restanten en ontstekingscellen) zullen we pas 3 dagen na de operatie starten met de toediening. Hoewel de osmotische pompjes na ongeveer 2 weken leeg zijn, laten we ze zitten tot het eindpunt

op 8 weken na de operatie (minste ongerief). Omdat we denken dat de eerste weken cruciaal zijn voor chondrogene differentiatie van stamcellen, achten we het niet nodig om na de eerste 2 weken nieuwe te plaatsen.

Hieronder de volgorde van de handelingen in de tijd voor deze procedure:

dag 0: openen gewricht en aanbrengen kraakbeenschade

dag 3: start toediening kinase remmer via osmotische pompjes, orale gavage of drinkwater

dag 56: kniegewricht voor histologie

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power ($1 - \beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Soort: Onderzoek naar kraakbeen kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een interactie tussen de weefsels in het gewricht die vergelijkbaar is met de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem.

Stam: De C57BL/6 muis toont net als de mens nauwelijks spontaan kraakbeenherstel. In eerdere studies aan kraakbeenherstel die ik heb gevonden, worden de gebruikte muizen nergens verder gedefinieerd dan C57Bl/6. Gezien de geringe instroom van cellen in het kraakbeendefect die we hebben gezien in een pilot experiment in de C57Bl/6 N die we normaal gebruiken, willen we in een eerste experiment kijken of er misschien meer instroom van stamcellen en spontaan kraakbeenherstel is in de C57Bl/6 J stam. Zoals eerder vermeld in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen de experimenten in eerste instantie worden uitgevoerd met de C57Bl/6 muis die, net als de mens, nauwelijks spontaan herstel van kraakbeenschade laat zien. Een risico is dat onze in vitro voorscreening is gebaseerd op uitrijping van de stamcel, terwijl de niet herstellende muizenstam mogelijk op een eerder niveau faalt, zoals bij de recrutering van de stamcellen; we zagen immers in eerdere experimenten met C57Bl/6 muizen geen cellen binnenkomen in het kraakbeendefect. Daarom zullen we bij tegenvallende resultaten ook kijken of de proteïne kinase remmers herstel kunnen

versnellen in een muizenstam die het kraakbeen wél spontaan herstelt, zoals de DBA1 of de MRL/MpJ (gebruikt in de eerder genoemde studies van Fitzgerald 2008 en van Eltawil 2009). Dit is de reden dat we in de tabel hieronder geen muizenstam noemen.

Grootte exp. groep: Voor de bepaling van het juiste aantal dieren per experimentele groep kunnen we gebruik maken van de twee eerder genoemde studies waarin spontaan herstel van een kraakbeendefect werd vergeleken tussen de C57BL/6 muis en stammen die hun gewrichtskraakbeen gedeeltelijk kunnen herstellen (DBA/1 en MRL/MpJ). In deze studies was sprake van kleine effecten en grote spreidingen, waardoor voor de gewenste power groepen van 20 muizen noodzakelijk zijn. Hoewel in onze experimenten i.p.v. spontaan kraakbeenherstel, dit herstel wordt geïnduceerd door toediening van stoffen, moeten we in eerste instantie uitgaan van vergelijkbare effecten en spreidingen. Wanneer dat anders blijkt te liggen zullen we de grootte van de experimentele groepen reduceren.

Leeftijd en geslacht: In beide genoemde studies (Fitzgerald, 2008 en Eltawil, 2009) zijn mannetjes muizen van 8 weken gebruikt. Spontaan kraakbeen herstel bleek niet meer mogelijk in oudere dieren. Ook bleken mannetjes beter kraakbeenherstel te hebben dan vrouwtjes. Op basis van deze studies kiezen we voor mannetjes van 8 weken voor onze experimenten.

Schatting benodigd aantal dieren: Als we de invloed van een stof op kraakbeen herstel willen testen zullen we een optimale concentratie van die stof (berekend uit eigen in vitro experimenten en in vitro en in vivo experimenten in andere muis-modellen uit de literatuur) toedienen en dit vergelijken met het effect van het oplosmiddel (vaak DMSO of ethanol). Dat betekent dat we voor het testen van één stof $2 \times 20 = 40$ muizen nodig hebben. Op het moment hebben wij op basis van onze in vitro studies meerdere kandidaat stoffen (proteïne kinases) geselecteerd die afzonderlijk en of in combinatie getest kunnen worden m.b.t. kraakbeenregeneratie in de muizenknie. Zoals uitgelegd in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen zo een tiental stoffen of combinaties van stoffen getest worden. Deze zullen allereerst getest worden in DAP2, dus bij kraakbeenschade binnen een osteoartrose model. Hiervoor zijn $10 \times 40 = 400$ muizen nodig. Pas wanneer onder die omstandigheden succes wordt geboekt zal een remmer of combinatie van remmers ook in de DAP1 (staat model voor kraakbeenherstel na trauma) getest worden. Als dat in 75% van de experimenten het geval zou zijn (zeer optimistische schatting) zouden 320 muizen nodig zijn voor tests in DAP1.

Een probleem is uitval van muizen vanwege de narcose. Het type operatie voor DAP1 lijkt sterk op operaties voor het DMM model voor osteoartrose (beschreven in DAP2), waar we veel ervaring mee hebben. In deze experimenten bleek grofweg 5% van de muizen te overlijden door de narcose. Wij willen daarom rekening houden met een uitval van 5% om te voorkomen dat we te weinig dieren overhouden om statistisch betrouwbare data te verkrijgen. Hierdoor denken we voor DAP1, op basis van de tot op heden geselecteerde remmers, $320 + 16 = 336$ muizen nodig te hebben.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	Certified supplier	336	8 weken

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Helaas is er op dit moment geen alternatief voor het bestuderen kraakbeenregeneratie in vivo. Kraakbeen wordt ook beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Bovendien is het kraakbeen afhankelijk van beweging. Zonder beweging gaan belangrijke signaalroutes uit die het kraakbeen in stand houden. Daarom reageert kraakbeen zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt anders dan in een gewricht.

Vermindering

De remmers van intracellulaire signalerings routes worden vooraf getest in ons in vitro screening systeem. Dit bespaart veel muizen, doordat het merendeel van de kandidaat-stoffen al afvalt vóór de in vivo experimenten in de muis. Bovendien is er een kans dat we op basis van de eerste experimenten het aantal dieren per experiment kunnen verminderen. In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Als blijkt dat de effecten groter en de spreidingen lager zijn dan de studies die wij als leidraad hebben genomen, zullen wij het aantal dieren per experimentele groep verminderen. De benodigde groepsgrootte van 20 dieren is aanzienlijk, maar helaas zijn er in de muis geen alternatieven voor de studie aan herstel van beschadigd gewrichtskraakbeen beschikbaar.

Verfijning

We hebben gezien dat muizen na de operaties al snel weer hun normale gedrag en motoriek terug hebben. Onze laboranten hebben veel ervaring met de benodigde operaties en zijn in staat om de schade aan het gewrichtskapsel tot een minimum te beperken (voorkomt instabiliteit gewricht) en bloedingen optimaal te stelpen. Hierdoor zullen wij er mogelijk in slagen om de spreiding in de uitkomsten terug te dringen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

n.v.t.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden in de periode na de operatie. Dit kan namelijk effect hebben op het kraakbeen herstel, zowel rechtstreeks als door beïnvloeden van stoffen in het geactiveerde gewricht die wij juist bestuderen.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Verminderde beweeglijkheid of belastbaarheid van een geopereerde knie, waardoor de muis verminderde mobiliteit vertoont.

De muizen worden behandeld met kinase remmers via osmotische pompjes die drie dagen na de eerste operatie onder narcose zullen worden ingebracht onder de huid (incisie + hechten). Een tweede operatie onder narcose in korte tijd geeft extra risico op overlijden door de narcose. Van de pompjes zelf lijken de muizen weinig last te hebben. In plaats van pompjes kunnen ook orale gavages (2xdaags over een periode van minimaal 2 weken) worden gebruikt om de remmers toe te dienen. Dit kan stress veroorzaken.

Explain why these effects may emerge.

Er is een geringe kans dat de knie door de operatie ontstoken raakt of als gevolg van het kraakbeendefect of vrijgekomen debris niet goed meer functioneert, waardoor een dier verminderde mobiliteit vertoont

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

Steriel werken tijdens de operatie is van belang om infecties te voorkomen (hoewel muizen weinig gevoelig voor infecties zijn gebleken tijdens dit type operaties)

Ook moet zorgvuldig worden geopereerd (minimale aantasting van gewrichtskapsel), omdat anders de stabiliteit van het gewricht te zeer aangetast wordt.

Ook moeten de gaatjes in het kraakbeen worden ontdaan van vrijgekomen materiaal, dat anders gaat zwerven in het gewricht.

Orale gavages moeten worden uitgevoerd door ervaren biotechnici, om stress en beschadiging te vermijden

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.

Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste 2 dagen nog wat ontzien, maar is er daarna weer een normaal looppatroon. Humane eindpunten zijn derhalve: op dag 2 na de operatie de poot niet belasten en herhaaldelijk blijven liggen. Soms overlijden muizen tijdens de narcose, of vrij snel erna. Muizen die een dag later nog steeds problemen hebben door de narcose en daarom uit experiment moeten worden genomen, zien we nooit, maar als het zou gebeuren dat een dier inactief is of evenwichtsstoornissen heeft 2 dagen na de operatie zullen we dat uit experiment nemen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%. In een pilot experiment waarin we op deze wijze kraakbeenschade induceerden, zagen we alleen de eerste 2 dagen een afwijkend looppatroon bij de behandelde muizen, en geen verdere problemen gedurende de rest van de periode van 8 weken. Ook de histologie op het eind van het experiment (8weken) toonde weinig gevolgen voor het gewricht, behalve een geringe mate van osteofyt vorming.

K. Classification of severity of procedures

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

matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

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

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht

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.

Omdat in OA patiënten de behoefte aan kraakbeenreparatie erg groot is, is het belangrijk om stoffen die kraakbeenherstel induceren in vitro en in vivo, ook te testen in een OA model. De verwachting is, dat kraakbeenherstel in een OA gewricht extra moeilijk is, doordat de daar uitgescheiden factoren chondrogenese door stamcellen blokkeren, zoals dat onder andere in ons lab is aangetoond, in vitro. Om kraakbeenherstel te bestuderen in een OA achtergrond, moeten we in hetzelfde gewricht zowel kraakbeenschade als OA induceren. Gunstig is dat dit kan gebeuren in een en dezelfde operatie, zonder noemenswaardige vergroting van het ongerief voor de muis. Als de kraakbeenschade is aangebracht volgens animal procedure nummer 1, aanbrengen kraakbeenschade, is ook zicht op het ligament dat moet worden doorgesneden voor het DMM artrose model. Ook na deze experimenten met kraakbeen repair in een OA omgeving zal na 8 weken de histologische analyse van kraakbeen herstel het criterium zijn waarop de werkzaamheid van beschermende stoffen wordt beoordeeld.

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

In DAP2 wordt, net als in DAP1, met een naald een gaatje gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knie-schijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt. In een klein eerste experiment hebben wij reeds gezien dat wij deze gaatjes reproduceerbaar kunnen aanbrengen zonder al te veel verstoring van het gewricht.

Als de het gewricht is geopend en de kraakbeenschade is aangebracht, is ook zicht op het ligament dat moet worden doorgesneden voor het DMM (destabilisatie van mediale meniscus) osteoartrose(OA) model. Kraakbeenschade en gewrichtsinstabiliteit voor het DMM model zullen dus binnen dezelfde operatie worden aangebracht. Om het DMM model voor OA te induceren wordt d.m.v. een operatie onder anesthesie het gewrichtskapsel geopend om, na luxatie van de patella, het ligament waarmee de mediale meniscus aan de tibia is verbonden door te snijden. Vervolgens worden het kapsel en de huid gehecht. Deze technieken worden door onze medewerkers routinematig uitgevoerd. Na de operatie zal in de loop van 8 weken schade ontstaan door gewrichtsinstabiliteit. Dit artrose model gaat met weinig ontsteking gepaard.

Proteïne kinase remmers die in vitro chondrogenese bevorderen zullen worden toegediend via osmotische pompjes (onderhuids ingebracht), orale gavage 2x daags, gedurende 2 weken, of via het drinkwater. Om het gewricht na de operatie tot rust te laten komen (opruimen bloed restanten en ontstekingscellen) zullen we pas 3 dagen na de operatie starten met de toediening. Hoewel de osmotische pompjes na ongeveer 2 weken leeg zijn,

laten we ze zitten tot het eindpunt op 8 weken na de operatie (minste ongerief). Omdat we denken dat de eerste weken cruciaal zijn voor chondrogene differentiatie van stamcellen, achten we het niet nodig om na de eerste 2 weken nieuwe te plaatsen.

Hieronder de volgorde van de handelingen in de tijd bij animal procedure 2:

dag 0: openen gewricht en aanbrengen kraakbeenschade + doorsnijden ligament mediale meniscus (instabiliteit gewricht)

dag 3: start toediening kinase remmer via osmotische pompjes, orale gavage of drinkwater

dag 56: kniegewricht voor histologie

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Soort: Onderzoek naar kraakbeen kan het beste worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een interactie tussen de weefsels in het gewricht die vergelijkbaar is met de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem. Muizen ontwikkelen net als de mens ook spontaan artrose. Aangezien het DMM model wordt gebruikt om een OA achtergrond te verkrijgen binnen de kraakbeenherstel studies, zijn muizenstam, geslacht, en leeftijd gelijk aan die in animal procedure 1.

Grootte exp. groep: Voor de bepaling van het juiste aantal dieren per experimentele groep kunnen we gebruik maken van de twee eerder genoemde studies waarin spontaan herstel van een kraakbeendefect werd vergeleken tussen de C57BL/6 muis en stammen die hun gewrichtskraakbeen

gedeeltelijk kunnen herstellen (DBA/1 en MRL/MpJ). In deze studies was sprake van kleine effecten en grote spreidingen, waardoor voor de gewenste power groepen van 20 muizen noodzakelijk zijn. Hoewel in onze experimenten i.p.v. spontaan kraakbeenherstel, dit herstel wordt geïnduceerd door toediening van stoffen, moeten we in eerste instantie uitgaan van vergelijkbare effecten en spreidingen. Wanneer dat anders blijkt te liggen zullen we de grootte van de experimentele groepen reduceren. Ons lab heeft veel ervaring met het DMM model. De grootte van de experimentele groepen is voor DMM normaal gesproken 8, op basis van eerdere experimenten (bij DMM gaan we uit van een standaard deviatie van 13 en een verschil van 20%, wat neerkomt op een n=waarde van 7,6. Dus afgerond 8 muizen per groep). Echter, de groepsgrootte wordt in dit geval bepaald door de mate van kraakbeenherstel, waarbij DMM zorgt voor een relevante activatie van het gewricht. De groepsgrootte zal dus zeker 20 dieren moeten zijn, zoals berekend voor DAP1 aan de hand van de beschikbare literatuur. Het valt niet te voorspellen of door de toevoeging van OA door het DMM model, aan animal procedure 1, de minimale grootte van de experimentele groepen nog moet worden verhoogd, dus houden we in eerste instantie ook in de combinatie een groepsgrootte van 20 dieren aan. Voor 1 experiment zijn dan 40 muizen nodig (20 met kinase remmer en 20 controle = alleen het oplosmiddel).

Op het moment hebben wij uit voorafgaande in vitro experimenten meerdere kandidaat stoffen (kinase remmers) geselecteerd die ook nog in combinatie getest kunnen worden. Zoals uitgelegd in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen zo een tiental stoffen of combinaties van stoffen getest worden. Deze zullen allereerst getest worden in DAP2, dus bij kraakbeenschade binnen een osteoartrose model. Hiervoor zijn $10 \times 40 = 400$ muizen nodig.

Een probleem is uitval van muizen vanwege de narcose. Bij de operaties voor het DMM model voor osteoartrose, waar we veel ervaring mee hebben, blijkt grofweg 5% van de muizen te overlijden door de narcose. Dat zal niet anders zijn nu we in DAP2 binnen een operatie zowel kraakbeenschade als DMM induceren. Wij willen daarom rekening houden met een uitval van 5% om te voorkomen dat we te weinig dieren overhouden om statistisch betrouwbare data te verkrijgen. Hierdoor denken we voor DAP2, op basis van de tot op heden geselecteerde remmers, $400 + 20 = 420$ muizen nodig te hebben.

Species mouse	Origin Certified supplier	Maximum number of animals 420	Life stage 8 weeks
------------------	------------------------------	----------------------------------	-----------------------

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Helaas is er op dit moment geen alternatief voor het bestuderen van artrose. Dit proces is een samenspel tussen alle weefsels in het gewricht, die ieder hun bijdrage leveren. Kraakbeenschade is het belangrijkste proces, maar dit wordt ook beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Bovendien is het kraakbeen afhankelijk van beweging. Zonder beweging gaan belangrijke signaalroutes uit die het kraakbeen in stand houden. Daarom reageert kraakbeen zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt anders dan in een gewricht. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren die gewrichten hebben die artrose ontwikkelen zoals in de mens en waarin dus ook het proces van kraakbeenherstel tijdens artrose bestudeerd kan worden.

Vermindering

De remmers van intracellulaire signalerings routes worden vooraf getest in ons in vitro screening systeem. Dit bespaart veel muizen, doordat het merendeel van de kandidaat-stoffen al afvalt vóór de in vivo experimenten in de muis. Bovendien is er een kans dat we op basis van de eerste experimenten het aantal dieren per experiment kunnen verminderen. In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Als blijkt dat de effecten groter en de spreidingen lager zijn dan de studies die wij als leidraad hebben genomen, zullen wij het aantal dieren per experimentele groep verminderen. De benodigde groepsgrootte van 20 dieren is aanzienlijk, maar helaas zijn er in de muis geen alternatieven voor de studie aan herstel van beschadigd gewrichtskraakbeen beschikbaar.

Verfijning

Tijdens artrose zullen de muizen pijn ervaren. Pijn is echter een wezenlijk aspect van artrose en zal invloed hebben op het al dan niet belasten van gewrichten. Deze belasting speelt weer een rol in het ontstaan van pathologie. In het DMM-model is gevonden dat pijn pas heel laat in het model detecteerbaar is (start 16-17 weken na inductie). Binnen de 2 maanden van onze experimenten is met de huidige technieken geen verhoogde pijngevoeligheid of wijziging van looppatroon aantoonbaar. We hebben gezien dat de muizen na de operatie al snel weer hun normale gedrag en motoriek terug hebben. Onze laboranten hebben veel ervaring met de benodigde operaties en zijn in staat om de schade aan het gewrichtskapsel tot een minimum te beperken (voorkomt instabiliteit gewricht) en bloedingen optimaal te stelpen. Hierdoor zullen wij er mogelijk in slagen om de spreiding in de uitkomsten terug te dringen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

n.v.t.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van artrose. Dit kan nl. een effect hebben op het verloop van de artrose, en op de stoffen die het gewricht maakt die invloed hebben op kraakbeenherstel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Verminderde beweeglijkheid of belastbaarheid van een geopereerde knie, waardoor de muis verminderde mobiliteit vertoont.

De muizen worden behandeld met kinase remmers via osmotische pompjes die drie dagen na de eerste operatie onder narcose zullen worden ingebracht onder de huid (incisie + hechten). Een tweede operatie onder narcose in korte tijd geeft extra risico op overlijden door de narcose. Van de pompjes zelf lijken de muizen weinig last te hebben. In plaats van pompjes kunnen ook orale gavages (2xdaags over een periode van minimaal 2 weken) worden gebruikt om de remmers toe te dienen. Dit kan stress veroorzaken.

Explain why these effects may emerge.

Er is een geringe kans dat de knie door de operatie ontstoken raakt of als gevolg van het deels losmaken van de mediale meniscus niet goed meer functioneert, waardoor een dier verminderde mobiliteit vertoont

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

Steriel werken tijdens de operatie is van belang om infecties te voorkomen

(hoewel muizen weinig gevoelig voor infecties zijn gebleken tijdens dit type operaties)

Ook moet zorgvuldig worden geopereerd (minimale aantasting van gewrichtskapsel), omdat anders de stabiliteit van het gewricht te zeer aangetast wordt.

Orale gavages moeten worden uitgevoerd door ervaren biotechnici, om stress en beschadiging te vermijden

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.

Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste 2 dagen nog wat ontzien, maar is er daarna weer een normaal looppatroon. Humane eindpunten zijn derhalve: op dag 2 na de operatie de poot niet belasten en herhaaldelijk blijven liggen. Soms overlijden muizen tijdens de narcose, of vrij snel erna. Muizen die een dag later nog steeds problemen hebben door de narcose en daarom uit experiment moeten worden genomen, zien we nooit, maar als het zou gebeuren dat een dier inactief is of evenwichtsstoornissen heeft 2 dagen na de operatie zullen we dat uit experiment nemen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein. naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%. In een pilot experiment waarin we op deze wijze kraakbeenschade induceerden, zagen we alleen de eerste 2 dagen een afwijkend looppatroon bij de behandelde muizen, en geen verdere problemen gedurende de rest van de periode van 8 weken. Ook de histologie op het eind van het experiment (8weken) toonde weinig gevolgen voor het gewricht, behalve een geringe mate van osteofyt vorming. Ook in het DMM model zien we alleen in de eerste 2 dagen na de operatie een afwijkend looppatroon en is na 8 weken de gewrichtsschade doorgaans nog zeer mild. Van de combinatie kraakbeenschade + inductie van DMM verwachten we geen extra problemen, omdat binnen dezelfde operatie om het gewricht te openen een prikje in het kraakbeen en het doorsnijden van een klein ligament weinig extra schade toevoegen.

K. Classification of severity of procedures

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

matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

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

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Bevordering van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht

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.

Schade aan het gewricht trekt ontstekingscellen aan, zoals PMNs en macrofagen. Dat betekent dat kraakbeenherstel ook belemmerd kan worden door ontstekingsfactoren. Daarom willen protein kinases die kraakbeenherstel door stamcellen blijken te bevorderen in animal procedure 2, ook bestuderen tegen een lichte ontstekingsachtergrond. In animal procedure 3 wordt een ontstekingsprikkel zoals zymosan intra-articulair geïnjecteerd in een kniegewricht met een kraakbeenbeschadiging. Ook na deze experimenten met kraakbeen repair in een door lichte ontsteking geactiveerd gewricht zal na 8 weken de histologische analyse van kraakbeen herstel het criterium zijn waarop de werkzaamheid van beschermende stoffen wordt beoordeeld.

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

In DAP3 wordt, net als in DAP1 en DAP2, met een naald een gaatje gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knie-schijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt. In een klein eerste experiment hebben wij reeds gezien dat wij deze gaatjes reproduceerbaar kunnen aanbrengen zonder al te veel verstoring van het gewricht.

Protein kinase remmers die in vitro chondrogenese bevorderen zullen worden toegediend via osmotische pompjes (onderhuids ingebracht), orale gavage 2x daags, gedurende 2 weken, of via het drinkwater. Om het gewricht na de operatie tot rust te laten komen (opruimen bloed restanten en ontstekingscellen) zullen we pas 3 dagen na de operatie starten met de toediening. Hoewel de osmotische pompjes na ongeveer 2 weken leeg zijn, laten we ze zitten tot het eindpunt op 8 weken na de operatie (minste ongerief). Omdat we denken dat de eerste weken cruciaal zijn voor chondrogene differentiatie van stamcellen, achten we het niet nodig om na de eerste 2 weken nieuwe te plaatsen.

Muizen met aangebrachte kraakbeenschade in de knie zullen gelijk met de implantatie van osmotische pompjes (dus 3 dagen na aanbrengen van kraakbeenschade) intra-articulair worden ingespoten met een lage dosering zymosan of een andere ontstekingsprikkel. Bij deze techniek wordt een kleine snede gemaakt in de huid en de ontstekingsfactor door het kapsel in het gewricht gespoten. De techniek wordt door onze medewerkers routinematig uitgevoerd. Aangezien zymosan slechts een kortdurende lichte ontsteking veroorzaakt wordt de injectie drie maal herhaald met tussenpozen van twee dagen, zodat in ieder geval in de eerste weken, waarschijnlijk een belangrijke fase voor de uitrijping van stamcellen in het defect, lichte ontsteking aanwezig is.

Hieronder de volgorde van de handelingen in de tijd bij animal procedure 3:

dag 0: openen gewricht en aanbrengen kraakbeenschade

dag 3: start toediening kinase remmer via osmotische pompjes, orale gavage of drinkwater

dag 3, dag 5, dag 7, dag 9 intra-artculaire injecties ontstekingsprikkel

dag 56: kniegewricht voor histologie

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power ($1 - \beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Soort: Onderzoek naar kraakbeen kan het beste worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een interactie tussen de weefsels in het gewricht die vergelijkbaar is met de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem. Omdat we in DAP3 intra-articulaire injecties van een lichte ontstekingsprikkel gebruiken om een door ontsteking geactiveerd gewricht te verkrijgen binnen de kraakbeenherstel studies, zijn muizenstam, geslacht, en leeftijd gelijk aan die in animal procedure 1, aanbrengen van kraakbeenschade.

Grootte exp. groep: Voor de bepaling van het juiste aantal dieren per experimentele groep kunnen we gebruik maken van de twee eerder genoemde studies waarin spontaan herstel van een kraakbeendefect werd vergeleken tussen de C57BL/6 muis en stammen die hun gewrichtskraakbeen gedeeltelijk kunnen herstellen (DBA/1 en MRL/MpJ). In deze studies was sprake van kleine effecten en grote spreidingen, waardoor voor de gewenste power groepen van 20 muizen noodzakelijk zijn. Hoewel in onze experimenten i.p.v. spontaan kraakbeenherstel, dit herstel wordt geïnduceerd door toediening van stoffen, moeten we in eerste instantie uitgaan van vergelijkbare effecten en spreidingen. Wanneer dat anders blijkt te liggen zullen we de grootte van de experimentele groepen reduceren. De grootte van de experimentele groepen is bij intra-articulaire injecties van ontstekingsfactoren normaal gesproken 10 dieren, op basis van eerdere experimenten. Echter, de groepsgrootte wordt in dit geval bepaald door de mate van kraakbeenherstel, waarbij de ontstekingsfactor zorgt voor een relevante activatie van het gewricht. Voor animal procedure 1 is de vanuit de beschikbare literatuur de minimale groepsgrootte van 20 bepaald. De groepsgrootte zal dus zeker 20 dieren moeten zijn. Het valt niet te voorspellen of door de toevoeging van ontsteking aan animal procedure 1, de minimale grootte van de experimentele groepen nog moet worden verhoogd, dus houden we in eerste instantie ook in de combinatie een groepsgrootte van 20 dieren aan. Voor 1 experiment zijn dan 40 muizen nodig (20 met kinase remmer en 20 controle = alleen het oplosmiddel). Op het moment hebben wij op basis van onze in vitro studies meerdere kandidaat stoffen (proteïne kinases) geselecteerd die afzonderlijk en of in combinatie getest kunnen worden m.b.t. kraakbeenregeneratie in de muizenknie. Zoals uitgelegd in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen zo een tiental stoffen of combinaties van stoffen getest worden. Deze zullen allereerst getest worden in DAP2, dus bij kraakbeenschade binnen een osteoartrose model. Hiervoor zijn $10 \times 40 = 400$ muizen nodig. Pas wanneer onder die omstandigheden succes wordt geboekt zal een remmer of combinatie van remmers ook in DAP3 (staat model voor kraakbeenherstel tegen een ontstekingsachtergrond) getest worden. Als dat in 75% van de experimenten het geval zou zijn (zeer optimistische schatting) zouden 320 muizen nodig zijn voor tests in DAP3.

Een probleem is uitval van muizen vanwege de narcose. Het type operatie voor DAP1 lijkt sterk op dat van DAP2 (DMM model voor osteoartrose), waar we veel ervaring mee hebben. In deze experimenten bleek grofweg 5% van de muizen te overlijden door de narcose. Wij willen daarom rekening houden met een uitval van 5% om te voorkomen dat we te weinig dieren overhouden om statistisch betrouwbare data te verkrijgen. Hierdoor denken we voor DAP3, op basis van de tot op heden geselecteerde remmers, $320 + 16 = 336$ muizen nodig te hebben.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	Certified supplier	336	8 weken

C. Re-use

Will the animals be re-used?

C. Re-use

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Helaas is er op dit moment geen alternatief voor het bestuderen van kraakbeenregeneratie in vivo. Kraakbeen wordt ook beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Bovendien is het kraakbeen afhankelijk van beweging. Zonder beweging gaan belangrijke signaalroutes uit die het kraakbeen in stand houden. Daarom reageert kraakbeen zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt anders dan in een gewricht.

Vermindering

De remmers van intracellulaire signalerings routes worden vooraf getest in ons in vitro screening systeem. Dit bespaart veel muizen, doordat het merendeel van de kandidaat-stoffen al afvalt vóór de in vivo experimenten in de muis. Bovendien is er een kans dat we op basis van de eerste experimenten het aantal dieren per experiment kunnen verminderen. In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Als blijkt dat de effecten groter en de spreidingen lager zijn dan de studies die wij als leidraad hebben genomen, zullen wij het aantal dieren per experimentele groep verminderen. De benodigde groepsgrootte van 20 dieren is aanzienlijk, maar helaas zijn er in de muis geen alternatieven voor de studie aan herstel van beschadigd gewrichtskraakbeen beschikbaar.

Verfijning

We hebben gezien dat muizen na de operaties al snel weer hun normale gedrag en motoriek terug hebben. Onze laboranten hebben veel ervaring met de benodigde operaties en zijn in staat om de schade aan het gewrichtskapsel tot het uiterste te beperken (voorkomt instabiliteit gewricht) en bloedingen optimaal te stelpen. Hierdoor zullen wij er mogelijk in slagen om de spreiding in de uitkomsten terug te dringen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

n.v.t.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens kraakbeen repair in een licht ontstoken gewricht. Dit kan namelijk effect hebben op het kraakbeen herstel, zowel rechtstreeks als door beïnvloeden van stoffen in het geactiveerde gewricht die wij juist bestuderen.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Verminderde beweeglijkheid of belastbaarheid van een geopereerde knie, waardoor de muis verminderde mobiliteit vertoont. Na een injectie van de ontstekingsprikkel kan de muis zich ook korte tijd ziek voelen (koorts, ineengedoken, haren overeind).

De muizen worden behandeld met kinase remmers via osmotische pompjes die drie dagen na de eerste operatie onder narcose zullen worden ingebracht onder de huid (incisie + hechten). Een tweede operatie onder narcose in korte tijd geeft extra risico op overlijden door de narcose. Van de pompjes zelf lijken de muizen weinig last te hebben. In plaats van pompjes kunnen ook orale gavages (2xdaags over een periode van minimaal 2 weken) worden gebruikt om de remmers toe te dienen. Dit kan stress veroorzaken.

Explain why these effects may emerge.

Er is een geringe kans dat de knie door de operatie ontstoken raakt of als gevolg van het kraakbeendefect of vrijgekomen debris niet goed meer functioneert, waardoor een dier verminderde mobiliteit vertoont. Hoewel wij een geringe dosis van de ontstekingsprikkels inspuiten kan de muis zich misschien toch kort een beetje ziek voelen.

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

Steriel werken tijdens de operatie is van belang om infecties te voorkomen (hoewel muizen weinig gevoelig voor infecties zijn gebleken tijdens dit type operaties)
Ook moet zorgvuldig worden geopereerd (minimale aantasting van gewrichtskapsel), omdat anders de stabiliteit van het gewricht te zeer aangetast wordt.
Ook moeten de gaatjes in het kraakbeen worden ontdaan van vrijgekomen materiaal, dat anders gaat zwerven in het gewricht.
Orale gavages moeten worden uitgevoerd door ervaren biotechnici, om stress en beschadiging te vermijden

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.

Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste 2 dagen nog wat ontzien, maar is er daarna weer een normaal looppatroon. Humane eindpunten zijn derhalve: op dag 2 na de operatie de poot niet belasten en herhaaldelijk blijven liggen. Soms overlijden muizen tijdens de narcose, of vrij snel erna. Muizen die een dag later nog steeds problemen hebben door de narcose en daarom uit experiment moeten worden genomen, zien we nooit, maar als het zou gebeuren dat een dier inactief is of evenwichtsstoornissen heeft 2 dagen na de operatie zullen we dat uit experiment nemen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%. In een pilot experiment waarin we op deze wijze kraakbeenschade induceerden, zagen we alleen de eerste 2 dagen een afwijkend looppatroon bij de behandelde muizen, en geen verdere problemen

gedurende de rest van de periode van 8 weken. Ook de histologie op het eind van het experiment (8weken) toonde weinig gevolgen voor het gewricht, behalve geringe mate van osteofyt vorming.

K. Classification of severity of procedures

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

matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

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

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

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

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0086
2. Titel van het project: Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 24-01-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 21-02-2017
 - ☐ anderszins behandeld: 04-04-2017 en 05-05-2017 door kleine commissie
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 28-02-2017 tot 04-04-2017 en van 10-04-2017 tot 05-05-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 04-04-2017 en 05-05-2017
 - ☒ advies aan CCD: 30-05-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 28-02-2017
 - Datum antwoorden: 04-04-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-2.1: Is dit zuiver basaal wetenschappelijk onderzoek? De DEC meent dat positieve resultaten waarschijnlijk op korte termijn kunnen worden toegepast in de kliniek, waardoor dit onderzoek mogelijk ook translationele waarde heeft.

Antwoord: De DEC merkt terecht op dat dit onderzoek mogelijk ook translationale waarde heeft. De wetenschappelijke vraag die ten grondslag ligt aan de voorafgaande in vitro experimenten is welke intracellulaire routes worden gebruikt door nadelige stoffen uit het OA gewricht. Verder onderzoek kan leiden tot identificatie van de verantwoordelijke stoffen. De dierexperimenten moeten aangeven of de gevonden signaalroutes ook belangrijk zijn in vivo. Inderdaad is het onderzoek gericht op kraakbeenherstel door stamcellen en als er remmers worden gevonden die dit proces in de muis verbeteren, zal de stap naar de kliniek klein zijn.

Een aantal van de te testen remmers wordt immers al gebruikt voor behandeling van verschillende aandoeningen van de mens. Zowel basaal als translationeel zijn nu aangekruist

-3.1: Het blijft onduidelijk en zelfs onbesproken welke remmers onderzocht zullen worden en waarom de onderzoekers juist deze remmers willen bestuderen.

Antwoord: We hebben inderdaad alleen de te remmen signaalroutes benoemd en niet de gebruikte remmers. Ik heb nu de remmers die naar voren kwamen uit de aangehaalde studie expliciet genoemd.

-3.2: De doelstelling is erg algemeen gesteld. Welke signaleringsroutes zullen geremd worden en met welke remmers? (zie ook de vraag over 3.1)

Antwoord: Hier wordt nu terugverwezen naar de aangebracht verduidelijking in §3.1.

-3.3 Het maatschappelijke belang is voldoende toegelicht. De onderzoekers geven aan dat het basaal onderzoek betreft, maar toch ontbreekt een omschrijving van het wetenschappelijk belang van dit onderzoek.

Antwoord: Het wetenschappelijk belang zoals verwoord in beantwoording van de vraag over §2.1 is nu aangegeven.

-3.4: De in vitro experimenten die voorafgaan aan de experimenten zijn eigenlijk een wezenlijk onderdeel van deze onderzoekslijn. Ze zouden daarom uitgebreider beschreven kunnen worden in deze aanvraag, zodat duidelijker is welke selectie er plaatsvindt voordat stoffen getest worden in de dierproeven.

Antwoord: De in vitro experimenten die ten grondslag liggen aan de dierexperimenten zijn beschreven in §3.1, met vermelding van twee referenties. Ik heb op uw verzoek hier nu tevens vermeld dat bescherming van chondrogene differentiatie door de remmers werd beoordeeld op basis van histologie en mate van depositie van proteoglycanen (kraakbeen-specifieke extracellulaire matrix moleculen).

-3.4.1: De onderzoekers zullen drie diermodellen gebruiken die elk in een aparte DAP staan beschreven. Alle geselecteerde stoffen zullen eerst in het model van DAP1 worden getest, waarna veelbelovende remmers hetzij in het model van DAP2, hetzij in het model van DAP3 getest zullen worden. De commissie begrijpt niet goed waarop de keuze voor één van beide modellen wordt gebaseerd, en waarom al bij voorbaat wordt uitgesloten dat bepaalde veelbelovende remmers in beide modellen getest worden.

Antwoord: Blijkbaar is het onduidelijk opgeschreven, maar het was niet de bedoeling om na succes in DAP1, voor verdere tests DAP2 of DAP3 uit te sluiten. Ook in verband met uw volgende vraag is besloten §3.4.1 grondig te herzien. Het is inderdaad zo dat de in vitro voorscreening is uitgevoerd in een osteoartrotisch milieu. We hadden in eerste instantie bedacht dat de lichte osteoartrotische verschijnselen na de operatie in de C57Bl/6 een goede opstap zouden vormen bij de in vivo experimenten, maar bij nader inzien is toch een start in de combinatie van DAP1 en DAP2, dus binnen een gevalideerd OA model, te prefereren. Niet alleen omdat dit klinisch relevanter is, maar ook omdat we de mogelijkheid open willen houden om een andere, minder OA-gevoelige muizenstam te gaan gebruiken, als de C57Bl/6 muis niet geschikt blijkt voor deze studies. Door deze verandering in research strategy zijn volgordes ook veranderd in §3.4.2 en §3.4.3.

-3.4.1: In aanvulling op de vorige vraag: in het model van DAP1 is er geen osteoartrose, terwijl de bevinding is dat de uitrijping van stamcellen juist wordt geblokkeerd in een osteoartrotische omgeving. Er wordt aangenomen dat er een licht artrotisch milieu ontstaat door het aanbrengen van een kraakbeenlaesie bij de C57Bl/6 muis. Treedt in dit milieu de

inhibitie van uitrijping van stamcellen plaats? De rationale voor het gebruik van het diemodel zoals beschreven in DAP1 is onvoldoende toegelicht. Is dit een valide model voor de klinische situatie? Waarom is het niet afdoende om de remmers te testen in de modellen van DAP2 en DAP3, die de klinische situatie beter benaderen? Het ongerief voor de dieren is niet groter in DAP2 en DAP3 dan in DAP1, en het zou een besparing van dieren kunnen betekenen.

Antwoord: Zie de beantwoording van de vorige vraag. Uw opmerkingen hebben geleid tot een grondige herziening van §3.4.1.

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

-A2: Bedoelen de onderzoekers orale gavage waar zij orale toediening opschrijven? Welke frequentie van deze toediening verwachten de onderzoekers?

Antwoord: Inderdaad wordt orale gavage bedoeld; dit is aangepast. De remmers zouden 2x daags moeten worden toegediend.

-A2: Blijven de osmotische pompjes 8 weken werken? Een omschrijving van het aanbrengen en eventueel vervangen van de pompjes ontbreekt.

Antwoord: De osmotische pompjes zullen ongeveer een maand werken. Dit is geen bezwaar aangezien wij denken dat de eerste weken van de behandeling voldoende zijn om uitrijping van stamcellen mogelijk te maken. De pompjes kunnen daarna gewoon blijven zitten. De DEC merkt terecht op dat wij het aanbrengen van de pompjes niet omschreven hebben. Dit is nu in alle drie de DAPs toegevoegd.

-B: De groepsgrootte lijkt vrij fors. Zijn de kleine effecten die de onderzoekers willen opsporen nog wel klinisch relevant?

Antwoord: Wij moeten onze groepsgroottes baseren op wat bekend is in de literatuur. Daar vinden we echter alleen studies die spontaan kraakbeenherstel vergelijken. Daar zijn grote groepen nodig vanwege kleine effecten en grote spreidingen. Hopelijk valt dat beter uit in onze experimenten, waarin we spontaan herstel hopen te stimuleren. In dat geval maken we de groepen kleiner. En inderdaad: hoe duidelijker de effecten, hoe relevanter ze zijn.

-B: De onderzoekers noemen 5 tot 25% uitval door de narcose. De commissie vindt 25% uitval door de narcose niet acceptabel. Wanneer dit slechts éénmaal is voorgekomen en de oorzaak hiervan inmiddels is achterhaald, dan is dit geen afspiegeling van de normale praktijk. In dat geval worden de onderzoekers verzocht dit anders te formuleren. De commissie vindt 5% extra dieren vanwege uitval door de narcose realistischer hoewel nog steeds aan de forse kant. De onderzoekers worden verzocht het aantal extra gevraagde dieren aan te passen.

Antwoord: Het is juist dat de uitval door de narcose meestal lager ligt, rond 5%. Het narcosemiddel waarmee wij ervaring hebben, ffx, gaf af en toe boven de 10% sterfte, en als dat allemaal in dezelfde experimentele groep terecht komt is dat een ramp. Inmiddels blijkt dexdomitor + ketamine de nieuwe narcose procedure te zijn en daar hebben wij geen ervaring mee. Bij navraag bij de biotechnici bleek dat 5% uitval ook bij het nieuwe middel als reële schatting wordt gezien. Het aantal extra gevraagde dieren is op basis van deze informatie aangepast.

-B: De berekening van het aantal dieren is gebaseerd op de beschikbare mankracht in plaats van op het design van de experimenten die nodig zijn om het doel van de projectaanvraag te behalen. De overwegingen die meespelen bij de keuzes voor het testen van een combinatie

van remmers en het testen van een extra dosering zijn niet vermeld. De onderzoekers worden verzocht de onderbouwing voor het aantal dieren aan te passen.

Antwoord: De berekeningen zijn nu uitgevoerd op basis van de concrete experimenten met de remmers die we op grond van tot op heden uitgevoerd in vitro voorwerk hebben geselecteerd. Omdat we gezien hebben dat JAK- en TAK1-remming in vitro additief effect kunnen hebben, willen we in vivo ook combinaties van remmers testen. We hebben dit alles nu uitgelegd in §3.4.1, waar we steeds naar verwijzen bij de berekeningen van de aantallen dieren. Op deze wijze komen we bovendien tot een lagere schatting van het aantal benodigde muizen.

-B: Wanneer blijkt dat het C57Bl/6 model niet voldoet, dan willen de onderzoekers (een) andere muizenstam(men) gebruiken. De commissie adviseert daarom de naam van de muizenstam in de tabel onderaan dit onderdeel achterwege te laten.

Antwoord: De DEC merkt terecht op dat wij een definitieve keuze voor een muizenstam nog niet kunnen maken. De naam van de muizenstam in de tabel is nu voor alle drie de DAPs weggelaten.

-I: Niet alle bronnen van ongerief zijn vermeld: orale gavages en plaatsing van minipomp ontbreken.

Antwoord: Dit is nu aangevuld.

-J: Muizen overlijden niet soms maar bij hoge uitzondering door narcose. S.v.p aanpassen.

Antwoord: Grofweg 5% van de muizen blijkt helaas te overlijden door narcose. Dat is niet "bij hoge uitzondering" en misschien zelfs meer dan "soms". Met uw welnemen laat ik dit zo staan. Voor de criteria voor het bepalen van humane eindpunten is deze zin niet belangrijk; indien gewenst verwijder ik dit helemaal.

NB: De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en DAP3.

Antwoord: Veranderingen zijn in alle drie de DAPs doorgevoerd

*DAP3

-A2: De timing van de toediening van de ontstekingsprikkel is niet duidelijk onderbouwd. Waarom wordt de remmer al gegeven (dag 3) voordat er een lichte ontstekingsachtergrond is (dag 4-10)?

Antwoord: Het klopt dat we dit niet uitgelegd hebben. Tijdens in vitro experimenten is het gebruikelijk om een remmer eerder toe te dienen dan de factor die je wilt remmen. Dit hebben we naar in vivo meegenomen, maar dat is bij nader inzien niet zo logisch meer. Voor klinische relevantie zou het beter zijn de remmer toe te voegen als de ontstekingsachtergrond er al is. Bovendien scheelt dit ook nog eens een verdoving voor de dieren als de injectie van de ontstekingsprikkel gedurende de narcose voor het inbrengen van de pompjes kan plaatsvinden. We hebben de timing om deze redenen aangepast.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Wijzigingen in de NTS zijn aangebracht in blauw.

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum vragen: 10-04-2017
- Datum antwoorden: 04-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

-Kunnen de go/no go beslissingen wat duidelijker gepresenteerd worden in 3.4?

Antwoord: De go/no go beslissingen staan reeds in de tekst vermeld. Als een remmer niet werkt in DAP2, wordt deze niet ook nog eens in DAP1 of DAP 3 uitgetest. Omdat we in vitro additieve effecten van TAK1 remming en JAK remming hebben gezien willen we ze in vivo ook in combinatie testen, maar dat alléén wanneer beide afzonderlijk een gunstig effect laten zien; is dat niet het geval dan vervallen dus de experimenten waarin remmers van TAK1 en JAKs worden gecombineerd. Voor extra duidelijkheid heb ik dit nu expliciet vermeld in onderdeel 3.4.3.

-De beantwoording van de vraag over bijlage 1, onderdeel B over de groepsgrootte is niet doorgevoerd in DAP2 en DAP3. Het naar beneden bijstellen van de groepsgroottes indien blijkt dat een significant resultaat behaald kan worden met kleinere groepen wordt hierin niet vermeld.

Antwoord: Naar aanleiding van het uw advies in uw derde opmerking (zie beneden), heb ik per DAP nu alle onderdelen besproken, onder andere in de verantwoording van de groepsgroottes. Dit zorgt ervoor dat alle drie DAPs nu op zichzelf staan, en relevante zaken dus ook telkens opnieuw zijn vermeld.

-In DAP2 en DAP3 wordt verwezen naar procedures die in DAP1 zijn beschreven (aanbrengen van kraakbeenschade), maar dit is ongewenst. Graag alle procedures opnemen in DAP2 en DAP3 en de aantallen dieren en inschatting van het totale ongerief voor de dieren hierop baseren. De verwarrende verwijzingen in het projectvoorstel (DAP1+DAP2 wanneer het DMM-model met kraakbeenschade wordt bedoeld) kunnen dan ook vervangen worden door een verwijzing naar alleen DAP2 of DAP3.

Antwoord: Ik ben het met u eens dat het helderder is als elke DAP afzonderlijk een compleet verhaal is. Even wennen voor mij, want ik bouwde mijn verhaal uit vanuit DAP1. Ik heb uw advies gevolgd en in elke DAP nu alle componenten besproken en meegewogen in alle onderdelen.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief

individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd 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 van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen “tegenstrijdige” wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken welke signaalroutes het kraakbeenherstel door stamcellen negatief beïnvloeden, en te onderzoeken of het remmen van deze routes kraakbeenherstel kan bevorderen in muismodellen voor kraakbeenschade. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een therapie om kraakbeenschade door ongevallen en sportblessures of door osteoartrose bij mensen, paarden of honden te herstellen. Er is een veelheid aan stoffen die het herstel van gewrichtskraakbeen zouden kunnen belemmeren. Deze maken gebruik van een kleiner aantal intracellulaire signaalroutes. De aanvragers zullen het remmend effect van meerdere signaalroutes op kraakbeenherstel testen in muismodellen die de humane situaties zo goed mogelijk nabootsen. Deze kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van een behandeling met stamcellen die tot herstel van het kraakbeen leidt. Het is aannemelijk dat bij mensen, paarden en honden dezelfde signaalroutes betrokken zijn bij belemmering van kraakbeenherstel door stamcellen. Om te komen tot een effectieve therapie voor de doelgroep is nog meer vervolgonderzoek nodig. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van stoffen en hun signaalroutes die kraakbeenherstel belemmeren nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen om beschadigd kraakbeen te herstellen, en dat er behoefte is aan deze behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven.

Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt gezonder wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor invaliderende kraakbeenschade, die kan optreden na een ongeval of sportblessure of bij artrose, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - ☒ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
- De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: “Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens kraakbeen repair in een licht ontstoken gewricht. Dit kan namelijk effect hebben op het kraakbeen herstel, zowel rechtstreeks als door beïnvloeden van stoffen in het geactiveerde gewricht die wij juist bestuderen.” De DEC is het eens met deze onderbouwing.
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de operatie waarin kraakbeenschade wordt aangebracht en de gevolgen daarvan. De combinatie van alle handelingen leidt tot matig ongerief voor alle dieren.

12. De integriteit van dieren wordt aangetast doordat hun kniegewricht wordt beschadigd. Het dier wordt hierdoor gedurende enkele dagen gehinderd in zijn normale gedrag en zijn zelfredzaamheid neemt af.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaringen met deze diermodellen ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het project die in vitro bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk, aangezien kraakbeen anders reageert zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt. De aanvrager wil ook het kraakbeenherstel bij artrose en bij ontsteking onderzoeken. Hierbij zijn alle weefsels in het gewricht en het immuunsysteem betrokken, waardoor dit niet goed onderzocht kan worden zonder proefdieren.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoekszet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De muis is de minst complexe diersoort met kraakbeen en een immuunsysteem die voldoende overeenkomen met de humane situatie. Tijdens de knieoperaties wordt adequate pijnstilling gegeven. Post-operatieve pijnstilling wordt niet gegeven omdat dit kan interfereren met de resultaten van de proef. Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste twee dagen nog wat ontzien, en is er daarna weer een normaal looppatroon (waaruit wordt afgeleid dat het dier geen pijn meer heeft). Een deel van de dieren krijgt artrose in het kniegewricht, maar het experiment wordt al beëindigd voordat dit pijn oplevert. Bij een ander deel van de dieren wordt een lichte ontsteking in het kniegewricht aangebracht. Ook de hiermee gepaard gaande pijn kan niet bestreden worden omdat dit kan interfereren met de resultaten van de proef. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: Uit eerder onderzoek blijkt dat het kraakbeen van mannetjes beter herstelt dan het kraakbeen van vrouwtjes. In het algemeen is een groot effect (in dit geval kraakbeenherstel) makkelijker en met minder dieren vast te stellen. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de

doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Osteoartrose is een veelvoorkomende ziekte van de gewrichten die gepaard gaat met pijn en een beperking van de mobiliteit. Er is op dit moment geen genezende therapie bekend, waardoor patiënten zijn aangewezen op vervanging van het gewricht door een kunstgewricht via een operatie. Dit is niet altijd mogelijk voor alle aangedane gewrichten en kent ook nadelen. Wanneer het mogelijk wordt om beginnende kraakbeenschade te herstellen met stamcellen van de patiënt, dan leidt dit tot veel gezondheidswinst. De commissie acht het ontwikkelen van een genezende therapie voor osteoartrose van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken welke signaalroutes het kraakbeenherstel door stamcellen negatief beïnvloeden, en of het remmen van deze routes kraakbeenherstel kan bevorderen in muismodellen voor kraakbeenschade. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een therapie om kraakbeenschade door ongevallen en sportblessures of door osteoartrose bij mensen, paarden of honden te herstellen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de samenleving voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De dieren zullen mogelijk pijn ondervinden van de aangebrachte kraakbeenschade in één van beide kniegewrichten. Het bestrijden van deze pijn is niet mogelijk omdat dit het herstel van kraakbeen

met stamcellen kan beïnvloeden. De pijn is niet zo ernstig dat de dieren een afwijkend looppatroon ontwikkelen.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus .

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD1030020171924

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 mei 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171924. 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).

Datum:

2 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171924

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10
Postbus: 9101, 
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

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 juli 2017
Geplande einddatum: 30 juni 2022
Titel project: Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 30 mei 2017

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**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

AVD1030020171924

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 juni 2017

Vervaldatum: 2 juli 2017

Factuurnummer: 171924

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 [REDACTED]

projectnummer: 2016-0086 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171924	€ 1.541,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

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

Verzonden: vrijdag 23 juni 2017 11:55

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD1030020171924: Aanhouden beoordelen

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn,

Op 30 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren met aanvraagnummer AVD1030020171924. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

- U geeft aan dat alleen mannelijke dieren gebruikt zullen worden. De onderbouwing hiervoor is echter niet voldoende. In de aanvraag wordt aangegeven dat mannetjes beter kraakbeen herstel hebben. In een van de studies waarnaar gerefereerd wordt, worden mannelijke en vrouwelijke dieren inderdaad vergeleken. De variatie binnen de proefgroepen is in deze studie echter groot en de verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren is niet significant. U wordt daarom gevraagd uw keuze voor het gebruik van alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen. Hierbij wordt u verzocht aandacht te besteden aan de verwachte toename van het aantal dieren indien zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden.

Opsturen informatie

De CCD zou u aanvraag graag in de eerstvolgende vergadering bespreken. Om die reden zouden wij uw reactie graag uiterlijk donderdag 29 juni ontvangen. Mocht dit niet haalbaar zijn, u heeft 14 dagen de tijd om de vragen te beantwoorden. U kunt uw reactie aanleveren via NetFTP en e-mail.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Namens,

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)

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Op 23 juni 2017 ontving ik uw verzoek om extra informatie te verschaffen bij mijn aanvraag voor een projectvergunning dierproeven. Het gaat om het project *Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren*, met aanvraagnummer AVD1030020171924.

Uw vraag was: *U geeft aan dat alleen mannelijke dieren gebruikt zullen worden. De onderbouwing hiervoor is echter niet voldoende. In de aanvraag wordt aangegeven dat mannetjes beter kraakbeen herstel hebben. In een van de studies waarnaar gerefereerd wordt, worden mannelijke en vrouwelijke dieren inderdaad vergeleken. De variatie binnen de proefgroepen is in deze studie echter groot en de verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren is niet significant. U wordt daarom gevraagd uw keuze voor het gebruik van alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen. Hierbij wordt u verzocht aandacht te besteden aan de verwachte toename van het aantal dieren indien zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden.*

Onze reactie:

U merkt terecht op dat in de genoemde studie van Fitzgerald et al. geen verschil in kraakbeenregeneratie werd gevonden tussen C57Bl/6 mannen en vrouwen. Spontaan herstel is in deze stam bovendien zeer gering. In feite is dit de enige studie waarin in deze stam kraakbeen repair is vergeleken tussen mannen en vrouwen. De literatuur biedt dus geen rechtstreeks aanknopingspunt voor een keuze voor mannen of vrouwen in onze experimenten.

In de andere genoemde studie, van Eltawil et al. zijn alleen mannetjes C57Bl/6 (en DBA/1), bestudeerd zonder motivering van die keuze. Ook in meer recente in vivo studies aan kraakbeen herstel door stamcellen worden, ook zonder verdere motivering, mannetjes gebruikt. Bijvoorbeeld in de studie van, Leonard, C.A. et al: *Allogeneic bone marrow transplant from MRL/MpJ super-healer mice does not improve articular cartilage repair in the C57Bl/6 strain. PLoS ONE 10:1-14, 2015*, mannetjes werden gebruikt van de C57Bl/6 en MRL/MpJ stammen. In de literatuur wordt dus zonder onderbouwing steeds gekozen voor mannetjes muizen in kraakbeen herstel studies.

Het besluit om op basis van de studie van Fitzgerald et al. te kiezen voor het gebruik van mannetjes muizen berust op figuur 3c in deze studie, waarin getoond wordt dat in de MRL/MpJ muis duidelijk beter kraakbeen herstel wordt gemeten in mannetjes dan in vrouwtjes. De MRL/MpJ muis is een stam die meer spontaan kraakbeen herstel laat zien dan de C57Bl/6. Vandaar dat wij verwachten dat, als het ons lukt om in C57Bl/6 muizen in vivo chondrogenese te stimuleren, dit het beste tot uiting zal komen bij mannetjes. Een extra argument voor het gebruik van mannetjes muizen vond ik in de studie van Matsumoto, T. et al.: *The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells. Arthritis Rheum 58:3809-3819, 2008*. Stamcellen uit mannetjes C57Bl/10 bleken betere in vitro kraakbeenvorming en beter in vivo kraakbeenherstel te laten zien dan die uit vrouwtjes. Hierbij moet ik benadrukken dat ook dit een indirecte aanwijzing is omdat de oorsprong van de stamcellen (spier) in deze studie anders is dan in onze beoogde experimenten, waarin stamcellen uit subchondraal bot het defect moeten repareren. Bovendien is de C57Bl/10 muis gebruikt en niet de C57Bl/6. Na uitgebreid literatuuronderzoek is dit de beste wetenschappelijke onderbouwing voor de keuze voor mannetjes in onze beoogde experimenten. Mijn conclusie op basis van de literatuur is: als er al sexe-afhankelijke verschillen in kraakbeen repair worden gevonden, dan blijken mannetjes muizen of stamcellen uit mannetjes muizen dit beter te kunnen dan de vrouwtjes.

Daarnaast wil ik ingaan op uw verzoek om te proberen aan te geven wat de verwachte toename van het aantal benodigde dieren zou zijn indien zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt zouden worden.

In het artikel van Fitzgerald is in figuur 3C bij de C57Bl/6 stam de effect grootte en de spreiding vergelijkbaar bij mannetjes en vrouwtjes, dus zou het gebruik van beide geslachten grofweg een dubbeling van het aantal te gebruiken proefdieren betekenen.

In de MRL-stam, zou het benodigde aantal vrouwtjes door de lagere effect grootte, op basis van Figuur 3C van de Fitzgerald-paper, 2x zo hoog zijn als dat van mannetjes om tot dezelfde power te komen.

Samenvattend: de dieraantallen kunnen bij het meenemen van beide geslachten niet alleen verdubbelen, maar afhankelijk van de stam zelfs verdrievoudigen.

Wij zullen dus ook in het kader van vermindering van aantallen proefdieren bij voorkeur alleen mannetjes gebruiken.

Ik hoop hiermee uw vragen naar tevredenheid beantwoord te hebben

Met vriendelijke groet,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

██████████

Postbus 9101, ██████████

6500 HB NIJMEGEN



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020171924

Bijlagen

1

Datum 5 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Op 30 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren" met aanvraagnummer AVD1030020171924. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de onderbouwing voor het gebruik van mannelijke dieren.

Beslissing

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

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 5 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 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:
5 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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



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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 5 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren" met aanvraagnummer AVD1030020171924, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 mei 2017, ontvangen op 30 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers				
	Muizen (Mus musculus) /	336	100% Matig	
3.4.4.2. Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht				
	Muizen (Mus musculus) /	420	100% Matig	
3.4.4.3. Bevordering van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht				
	Muizen (Mus musculus) /	336	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD1030020171924

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 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:

AVD1030020171924

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:

AVD1030020171924

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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.