

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20171984	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		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					
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1984

1.

08 JUNI 2017



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10300
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	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
		Straat en huisnummer	Geert Grootplein 29
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>	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.	(Titel) Naam en voorletters	[redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[redacted]
		Afdeling	[redacted]
		Telefoonnummer	[redacted]
		E-mailadres	[redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | |
|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> |
| <input type="checkbox"/> Nee |

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 |
| <input type="checkbox"/> 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?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> 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?
- | |
|--|
| Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen? |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Kan de anti-ontstekingsstof Interleukine-37 (IL37) de gewrichtsschade tijdens experime |
|--|
- 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 [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

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	01 - 06 - 2017
Handtekening	[REDACTED]

**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.	Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?

2 Categories

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

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.
-

Artrose is een gewrichtsziekte die gekenmerkt wordt door progressief verlies van het kraakbeen. Dat wil zeggen dat artrose langzaam erger wordt en niet herstelt. Bij verlies van het kraakbeen ontstaat er wrijving tussen de onderliggende botten van het gewricht, wat zorgt voor veel pijn tijdens het bewegen van het aangedane gewicht. Dit beperkt artrosepatiënten sterk in hun dagelijkse bezigheden en vermindert hun kwaliteit van leven sterk. Op dit moment is er geen therapie om kraakbeenschade bij artrosepatiënten tegen te gaan of de progressie hiervan te remmen.

De oorzaak van het ontstaan van artrose is niet bekend. Vroeger werd vaak gedacht dat artrose ontstaat door veroudering en slijtage, maar steeds meer onderzoek wijst uit dat ontstekingsfactoren en kraakbeen afbrekende enzymen belangrijk zijn voor het artroseproces [1-4]. Gezond kraakbeen bestaat uit kraakbeencellen die omgeven zijn door matrix. Belangrijke componenten van deze matrix zijn proteoglycanen en collagenen. Proteoglycanen kunnen watermoleculen binden, wat ervoor zorgt dat het kraakbeen kan werken als een schokdemper. De collagenen zijn belangrijk voor de stevigheid en elasticiteit van het kraakbeen. Kraakbeencellen zijn verantwoordelijk voor het in stand houden van een gezonde matrix [5]. Dit doen zij door een balans te handhaven tussen de aanmaak van proteoglycanen en collagenen en de afbraak van deze matrix moleculen met behulp van matrix afbrekende enzymen zoals matrix metalloproteinases (MMPs) en a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs). Tijdens artrose vindt er een verhoging van matrix afbrekende plaats en ook ontstekingsfactoren zijn in staat om kraakbeencellen dusdanig te activeren, dat er verhoogde productie van MMPs en ADAMTSs is, hetgeen uiteindelijk leidt tot kraakbeenafbraak [6]. Behalve ontstekingsfactoren kan ook een hoge mechanische stress de kraakbeencel activeren tot productie van matrix afbrekende enzymen en leiden tot kraakbeenafbraak [7]. Het blokkeren van de productie van matrix afbrekende enzymen en ontstekingsfactoren is in beide gevallen een veelbelovende benadering om de progressie van kraakbeenschade te remmen.

Recente studies hebben Interleukine 37 (IL37) geïdentificeerd als nieuw lid van de IL1 familie. De meeste genen die behoren bij de IL1 familie hebben een sterk pro-ontsteking karakter, terwijl IL37 anti-ontstekings eigenschappen heeft en in staat is om de aangeboren immuunresponses te onderdrukken. Zo is aangetoond dat verhoging van de IL37 spiegels in de humane A549 epitheliale cellijn en de muis RAW macrofagen cellijn, de productie van ontstekingsfactoren als IL1 α , TNF α and IL6 verlaagt [8]. Daarnaast is aangetoond dat IL37 transgene muizen beschermd zijn tegen

LPS-geïnduceerde shock, hepatitis en longontsteking [8-10]. Voor muizen is geen IL37 homoloog gevonden, maar aangezien ze wel reageren op IL37 in de transgene diermodellen beschikken ze wel over de receptoren die nodig zijn voor het anti-ontstekings effect van IL37. De anti-ontstekings effecten van IL37 zijn ook gedemonstreerd in bloedcellen van reumatoïde artritispatiënten, waarin verhoging van de IL37 spiegels leidt tot een verlaagde productie van IL1 α , TNF α en IL6 [11].

Om aan te tonen dat het plausibel is dat IL37 positieve effecten heeft op kraakbeen en dus mogelijk een positief effect zou kunnen hebben in artrose, hebben we eerst *in vitro* experimenten uitgevoerd om te kijken of IL37 de potentie heeft om de productie van ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen te reduceren in kraakbeencellen van artrosepatiënten. Hiervoor hebben we kraakbeen ontvangen van artrose patiënten die een knie of heup vervanging kregen. In deze kraakbeencellen hebben we de IL37 spiegels verhoogd met behulp van een IL37-adenovirus, dat cellen aanzet tot productie van IL37. Vervolgens hebben we de kraakbeencellen gestimuleerd met ontstekingsfactoren zoals IL1 β , om een ontstekingsomgeving na te bootsten die lijkt op die in artrosepatiënten. Op zowel eiwit als gen niveau hebben we gevonden dat IL37 instaat is om zowel de ontstekingsfactoren IL1 β , IL6 en IL8 te verlagen, als de matrix afbrekende enzymen MMP1, MMP3, MMP13 en ADAMTS5 [12]. Doordat we hadden gevonden dat IL37 niet alleen de productie van ontstekingsfactoren verlaagt maar ook een direct effect kan hebben op het kraakbeen via de kraakbenafbrekende enzymen, wilden we ook het effect van IL37 op de proteoglycanen in de matrix van het kraakbeen bestuderen. Hiervoor hebben we kraakbeen biopsie genomen, ook wel explants genoemd, en deze geïncubeerd met recombinant-IL37 eiwit. Omdat we het directe effect van IL37 op het kraakbeen wilden bestuderen, hebben we voor deze experimenten geen ontstekings-component zoals IL1B toegevoegd. Voor dit experiment konden we geen IL37-adenovirus gebruiken, omdat een adenovirus te groot is om door te dringen door de matrix van het kraakbeen. We vonden dat IL37 significant de uitscheiding van proteoglycanen remt vanuit de kraakbeen explants met maar liefst 32% ten opzichte van de ongestimuleerde explants. Dit geeft aan dat IL37 in kraakbeen van artrose patiënten niet alleen de aanwezige ontsteking kan remmen en daarmee de progressie van kraakbeenschade kan voorkomen, maar dat IL37 waarschijnlijk ook de mate van kraakbeenafbraak tijdens artrose kan verminderen via een direct effect op het kraakbeen zelf zonder dat er ontsteking aanwezig is. Hierdoor kan IL37 een beschermend effect hebben tegen kraakbeenschade in verschillende typen van artrose, die hieronder in verschillende experimentele artrose modellen beschreven staan.

Met de resultaten uit de literatuur en op basis van onze eigen bevindingen, kunnen we zeggen dat IL37 een belangrijke rol speelt om ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen te remmen *in vitro*, in een situatie die artrose, zo goed als mogelijk is, *in vitro* na kan bootsen. We weten echter ook dat artrose een zeer complexe ziekte is, waarbij meerdere weefsels betrokken zijn en dat de oorzaak van artrose waarschijnlijk een combinatie is van metabole processen en mechanische belasting. Om echt iets te kunnen zeggen over het effect van IL37 op kraakbeenschade tijdens het proces van artrose, is het daarom belangrijk om IL37 te testen in een geheel intact gewricht. Hiervoor zullen we twee verschillende experimentele artrose modellen in muizen gebruiken, omdat in elk model een ander type artrose pathogenese is vertegenwoordigd:

DMM-model (destabilisatie van de mediale meniscus-model) [13]

In het DMM-model wordt het ligament waarmee de mediale meniscus van de knie aangehecht zit aan het bot doorgesneden onder narcose met pijnstilling. Vervolgens wordt het gewrichtskapsel en de huid gehecht. Dit zorgt ervoor dat de mediale meniscus niet langer stabiel op zijn natuurlijke plek vast zit en kan schuiven. Hierdoor ontstaat net als bij mensen met trauma-geïnduceerde artrose (bijvoorbeeld sporters), kraakbeenschade die initieel aan de zijde ontstaat waar de meniscus los zit. Dit model vertoont minimale ontsteking.

CiOA-model (collagenase-model) [14]

Bij het CiOA-model wordt intra-articulair maximaal 3 keer collagenase ingespoten. Dit zorgt ervoor dat de ligamenten slapper worden waardoor het gewricht instabiel wordt en er bovendien ontsteking optreedt. De ontsteking is in dit model prominent aanwezig in tegenstelling tot het DMM-model. Dit model is daarom representatief voor artrose bij mensen waarbij ontsteking van belang is.

Met de in dit voorstel beschreven proeven zullen we onderzoeken of IL37 beschermt tegen kraakbeenschade tijdens artrose in twee verschillende muismodellen. Deze proeven zullen inzicht verschaffen in welke type artrose IL37 een belangrijke therapeutische rol kan spelen. Mochten de resultaten uit deze dierstudies leiden tot de conclusie dat IL37 beschermt tegen artrose, dan gaan we op zoek naar een klinische toepassing voor IL37. Het toedienen van IL37 middels een adenovirus in artrose patiënten, brengt tot op heden te veel risico's met zich mee en is nog niet veilig voor artrose patiënten. Wel bestaan er andere mogelijkheden om IL37 therapeutisch te maken, zoals de ontwikkeling van een 'small molecule' die homoloog is aan IL37. Echter, eerst zullen we de resultaten uit de beschreven dierstudies moeten afwachten voordat we kunnen beginnen met de ontwikkeling van IL37-therapie voor artrose patiënten.

Referenties:

1. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013; 5:77-94
2. Kapoor M, Martel-Pelletier. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7:33-42
3. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1357-60
4. Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1237-47
5. Fox A, Bedi A. The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* 2009; 1(6):461-468
6. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(1):133-145
7. Buckwalter J, Anderson D. The roles of mechanical stresses in the pathogenesis of osteoarthritis. *Cartilage* 2013 4(4):286-294
8. Nold M, Nold-Petry C. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nature Immunology* 2010 11(11):1014-1024
9. Bulau A, Fink M. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis. *Scientific World Journal* 2011 11:2480-90
10. Moretti S, Bozza S. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *Plos Pathog* 2014 10(11)
11. Ye L, Jiang B. IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17 triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation. *J Immunol* 2015 194:5110-9
12. Van Geffen E, Van Caam A. IL37 dampens the IL1 β -induced catabolic status of human OA chondrocytes. *Rheumatology* 2016
13. Glasson S, Blanchet T. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007 15:1061-1069. Kraan P, Vitters E. Degenerative knee joint lesion in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J. Exp. Path* 1990 71:19-31

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?

Plaatsing van dit project: financiering en ons laboratorium

Dit project is onderdeel van een project dat is gefinancierd door het reumafonds getiteld "Interleukin-37 and phospho-Smad 3, critical couple in the prevention of chondrocyte activation and OA development". Ons laboratorium is expert op het gebied van artrose modellen [1-8]. Wij staan internationaal dan ook bekend om onze kennis en kunde op dit gebied en de unieke positie om meerdere artrose modellen en daarmee meerdere vormen van artrose te kunnen onderzoeken [9-11].

Hypothese en doelstellingen

Ontstekingsfactoren en verhoogde enzymatische activiteit van matrix afbrekende enzymen worden gezien als essentieel onderdeel in het ontstaan van kraakbeenschade. Onze hypothese is dan ook dat een door IL37-gemedieerde reductie in ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen zorgt voor het handhaven van de kraakbeen integriteit. IL37 is een relatief nieuw ontdekte anti-ontsteking cytokine, waarvan we *in vitro* hebben aangetoond dat IL37 de productie van ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen kan remmen. Echter, deze bevindingen van IL37 zijn nog nooit vertaald naar een effect op kraakbeenschade in een intact gewricht met artrose.

Onderzoeksdoel:

In dit project zullen we antwoord krijgen op de vraag of IL37 het artroseproces en de daarbij ontwikkelde gewrichtsschade kan remmen of zelfs voorkomen.

De deeldoelstellingen in dit project zijn:

1. Valideren en in kaart brengen van het expressieprofiel van het IL37-adenovirus. Voordat we beginnen met de experimentele artrosemodellen, zullen we eerst een experiment uitvoeren waarin we het expressieprofiel van het IL37-adenovirus gaan bepalen zodat we inzicht krijgen in hoe snel het adenovirus in staat is om hoge IL37 spiegels te produceren en hoe lang deze productie aanhoudt. Tegelijkertijd zullen we mogelijke neveneffecten van het IL37-adenovirus op het weefsel in het gewricht onderzoeken. Het is belangrijk om de resultaten van deze proeven te hebben voor een goede timing van injectie in onze experimentele artrosemodellen.
2. Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het DMM-model (model voor traumaïnduceerde artrose met zeer lage ontsteking)
3. Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het CiOA-model (collagenase model voor inductie van artrose waarbij naast laxiteit van het gewricht ook verhoogde mate van ontsteking een rol speelt).

We verwachten dat bovenstaande experimenten uitgevoerd kunnen worden binnen dit 5-jaren project: de voorgestelde diermodellen zijn gestandaardiseerd en worden binnen onze afdeling reumatologie regelmatig toegepast. De technieken voor het beoordelen van het effect van de interventie zijn geoptimaliseerd en frequent gebruikt.

Referenties:

1. van der Kraan PM, Vitters E. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J. Exp. Pathol (Oxford)* 1990; 71(1):19-31
2. van Osch GJ, van der Kraan PM. Induction of osteoarthritis by intra-articular injection of collagenase in mice. Strain and sex related differences. *Osteoarthritis and Cartilage* 1993; 1(3):171-7
3. van der Kraan PM, Vitters EL. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol.* 1989; 135(6):1001-14
4. van Dalen *et al.* Interleukin-1 is not involved in synovial inflammation and cartilage destruction in collagenase-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017; 25(3):385-396
5. de Munter W *et al.* High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; 24(5):844-55
6. van den Bosch M *et al.* Induction of Canonical Wnt Signaling by the Alarmins S100A8/A9 in murine knee joints: implications for osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2016; 68(1):152-163
7. Schelbergen RF *et al.* Prophylactic treatment with S100A9 inhibitor paquinimod reduces pathology in experimental collagenase-induced osteoarthritis. *Annals Rheumatic disease* 2015; 74(12):2254-8
8. Blaney Davidson E *et al.* Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage. *Annals of Rheumatic Disease* 2015; 74(6):1257-64
9. Thysen S *et al.* Targets, models and challenges in osteoarthritis research (Review). *Disease Models & mechanisms* 2015 8:17-30
10. Christiansen B *et al.* Non-invasive mouse models of post-traumatic osteoarthritis (Review). *Osteoarthritis and Cartilage* 2015 23:1627-1638
11. Brandt *et al.* Animal models of osteoarthritis (Review). *Biorhelogy* 2002 221-235.

3.3 Relevance

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

Artrose is de meest voorkomende gewrichtsziekte. Naar schatting waren er in 2015 in Nederland 1,2 miljoen bij mensen waarbij de huisarts de diagnose artrose heeft gesteld. De jaar prevalentie bij vrouwen is hoger dan bij mannen, met 92,4 artrose patiënten per 1000 vrouwen en 48,8 artrose patiënten per 1000 mannen. Knieartrose is de meest voorkomende artrose (594.000 personen), gevolgd door heupartrose (359.000) en artrose aan overige ledematen (357.000 personen) (Bron: RIVM).

Artrose komt vaker voor naarmate men ouder wordt. Gezien de vergrijzing in onze samenleving, zal het aantal mensen met artrose alleen maar toe gaan nemen. Artrose is geen aandoening waar mensen aan overlijden, maar de kwaliteit van het leven van de patiënten gaat dramatisch achteruit doordat ze veel minder mobiel zijn en vaker leiden aan depressies. Omdat afbraak van het kraakbeen een degeneratief proces is en het kraakbeen een beperkte reparatiecapaciteit heeft, is op dit moment een gewrichtsvervanging de enige oplossing die artsen kunnen bieden. Op langere termijn komt het voor dat er complicaties ontstaan, zoals een infectie van de gewrichtsprothese.

Naast een toename van aantal artrosepatiënten nemen ook de kosten van de zorg voor artrose toe. Deze bedroegen in 2011 1,1 miljard euro. Dat komt overeen met 1,2% van de totale kosten van de gezondheidszorg in Nederland. Het aandeel in de kosten voor artrose was groter voor vrouwen (71%) dan voor mannen (29%). Voor personen onder de 40 jaar waren de kosten relatief weinig (Bron: RIVM).

Deze studie zal inzicht verschaffen of IL37 het degeneratief proces van kraakbeenafbraak kan remmen of voorkomen. Tevens zullen we inzicht krijgen bij welke type artrose pathogenese IL37 een beschermend effect kan hebben op kraakbeenschade. Met deze resultaten kunnen we bepalen welk type artrosepatiënt mogelijk gebaat is bij behandeling met IL37 en dit zal nieuwe aangrijpingspunten opleveren voor een therapie voor artrose.

3.4 Research Strategy

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

Voor dit project zal gebruik worden gemaakt van het IL37-adenovirus, om het effect van IL37 te bestuderen op kraakbeenschade tijdens artrose. Hiervoor zal het adenovirus intra-articulair worden ingespoten in het kniegewricht van de muis, zodat hoge IL37 spiegels in het gewricht aanwezig zijn. Het adenovirus is gevalideerd *in vitro*, waarbij we hebben gezien dat het virus in staat is om zowel IL37 gen als eiwit expressie in kraakbeencellen te verhogen. Daarnaast hebben aangetoond dat dit virus *in vitro* ook in staat is de productie van ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen te reduceren, wat betekent dat het geproduceerde IL37 ook functioneel is.

Voordat we gaan starten met de experimentele artrosemodellen, zullen we een experiment uitvoeren om te bepalen of het IL37-adenovirus ook werkt in muizen. Hierin we testen hoe lang het duurt voordat het virus in staat is om hoge IL37 spiegels te produceren en hoe lang deze spiegels aanhouden. Met deze gegevens kunnen we een optimale timing van de IL37-adenovirus injecties bepalen die nodig zijn om de juiste condities en timing vast te stellen voor de experimentele artrosemodellen. Verder is er vanuit de literatuur bekend dat muizen geen IL37 homoloog hebben, waardoor we alvorens andere proeven uit te voeren met zekerheid willen uitsluiten dat dit virus om onvoorziene redenen schade aanbrengt aan het gewricht. In dergelijke gevallen zullen dan ook de overige proeven niet worden uitgevoerd. We achten de kans hierop zeer klein, omdat er in dit literatuur verschillende experimenten zijn beschreven waarbij muizen IL37 toegediend kregen. Hiervan zijn geen bijwerkingen beschreven. Echter, omdat IL37 nog nooit middels dit adenovirus is toegediend willen we dit met zekerheid uitsluiten.

Onze uitleesparameter is: kraakbeenschade

Om te onderzoeken of IL37 een beschermend effect heeft op kraakbeenschade tijdens artrose, zullen de muizen op verschillende tijdstippen na inzetten van de proef geofferd worden. Voor alle hieronder beschreven proeven geldt dat weefsels geïsoleerd worden voor bijvoorbeeld histologie, wash-outs en RNA.

- Op histologie kan structurele schade aan het gewricht worden vastgesteld met behulp van de gemodificeerde OARSI score [15]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van het kraakbeen alsmede de uitbreidbaarheid daarvan.
- Met behulp van wash-outs en RNA kunnen we op eiwit en gen niveau, respectievelijk, de kwaliteit van het kraakbeen en synovium beoordelen op markers van artrose, zoals de ontstekingsfactoren IL1 β , IL6 en IL8 en de matrix afbrekende enzymen MMPs en ADAMTSs.

Doelstelling 1: Validatie van het IL37-adenovirus in muizen (DAP1).

In deze proeven zullen we onderzoeken of het IL37-adenovirus in staat is om IL37 gen en eiwit spiegels tot expressie te brengen in muizen, hoe lang deze IL37 spiegels aanhouden en hoe de kinetiek verloopt. Tegelijkertijd zullen we onderzoeken of het IL37-adenovirus zelf geen schade aan het gewricht brengt. Hiertoe zullen we naïeve muizen injecteren met het IL37-adenovirus of luciferase (Luc)-controle virus, om te corrigeren voor mogelijk virus effect. Het totale experiment zal maximaal 28 dagen duren, waarbinnen op maximaal zeven verschillende momenten in tijd, bijvoorbeeld dag 0, 1, 3, 7, 14, 21 en 28 weefsels verzameld worden voor bijvoorbeeld histologie, wash-outs en RNA isolatie.

Na het vaststellen van de kinetiek van IL37 na adenovirale overexpressie en het uitsluiten van negatieve effecten van IL37 in het gewricht, zal het potentiële therapeutische effect van IL37 worden getest in twee diersmodellen voor artrose: de DMM (DAP 2) en de CiOA (DAP 3).

Doelstelling 2: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het DMM-model (DAP 2)

Het DMM-model is een equivalent aan trauma in mensen waarbij bijvoorbeeld dislocaties optreden. In dit model wordt door middel van transectie van het ligament, dat de mediale meniscus verbindt met de tibia, het gewricht instabiel gemaakt. Door ligament transectie schuift de meniscus opzij en ontstaat er instabiliteit. In eerste instantie ontstaat er kraakbeenschade aan de mediale zijde van het gewricht, maar later ook aan de laterale zijde. Dit is dus een goed model voor patiënten met artrose ten gevolge van trauma. In dit model is de ontsteking relatief laag en wordt daarom veelal afgezet met het hieronder beschreven CiOA-model, dat veel ontsteking heeft. In het DMM-model zullen we bestuderen of IL37 de inductie van gewrichtsschade kan vertragen of voorkomen en of IL37 de progressie van de al aanwezige gewrichtsschade kan remmen.

Om dit te onderzoeken zullen we in het DMM-model twee afzonderlijke experimenten uitvoeren, waarin het moment van start van de IL37-adenovirus injectie verschillend is:

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het DMM-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 leidt tot minder en vertraagde inductie van kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na trauma al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al echte gewrichtsschade aanwezig is in het DMM-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

Doelstelling 3: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het CiOA-model (DAP 3)

Het CiOA-model is een artrosemodel representatief voor patiënten met artrose en grote betrokkenheid van ontsteking. Het is een model waarbij instabiliteit en ontsteking voor artrose zorgen. Dit model wordt veroorzaakt door injectie van collagenase, wat ervoor zorgt dat de ligamenten van het gewricht slap worden en het gewricht instabiel. Dit gaat gepaard met meer ontsteking dan in het DMM model waarbij ontsteking amper aanwezig is. In het CiOA-model bepalen we of IL37 de gewrichtsschade kan vertragen of voorkomen en of IL37 de progressie van de al aanwezige gewrichtsschade kan remmen.

Om dit te onderzoeken zullen we in het CiOA-model twee afzonderlijke experimenten uitvoeren, waarin het moment van start van de IL37-adenovirus injectie verschillend is:

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het CiOA-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 instaat is om de geïnduceerde ontsteking te temperen en leidt tot minder en vertraagde kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na inductie van ontsteking aan het gewricht, door bijvoorbeeld knieletsel, al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al beginnende schade zichtbaar is in het CiOA-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen in een artrose model met ontsteking. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al beginnende schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

Doelstelling 1 is van belang voor het valideren van het IL37-adenovirus in muizen. Deze informatie hebben we nodig voor de timing van de IL37-adenovirus injecties in de experimentele artrosemodellen. Mochten we erachter komen dat het adenovirus niet functioneel is in muizen of al zichtbare schade aanbrengt aan het gewricht, dan hoeven we niet verder te gaan met de uitvoering van de experimentele artrosemodellen en moeten we een andere strategie bedenken om IL37 tot expressie te brengen in muizen. Naar eigen verwachting gebaseerd op onze ruime ervaring met adenovirus injecties in muizengewrichten en gebaseerd op de literatuur, gaan we ervan uit dat we hierbij geen problemen gaan ondervinden. In doelstelling 2 en 3 ligt de focus op het onderzoek naar het effect van IL37 op gewrichtsschade tijdens artrose. Aan de hand van doelstelling 2 en 3 kunnen we een uitspraak doen over welke type artrose pathogenese in welk stadium te behandelen is met IL37.

Referentie:

1. Pritzker K, Gay S. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006 15(1):13-29

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.

Doelstelling 1: Validatie van het IL37-adenovirus in muizen (DAP1).

In deze proeven onderzoeken we of het IL37-adenovirus in staat is het IL37 gen en eiwit tot expressie te brengen in het kniegewricht van muizen en tevens vaststellen hoe lang IL37 aanwezig blijft. Tegelijkertijd zullen we onderzoeken of IL37 zelf geen schade aan het gewricht brengt. Hiertoe zullen we naïeve muizen intra-articulair (in de knie) injecteren met het IL37-adenovirus of luciferase (Luc)-controle virus, om te corrigeren voor het virus effect. Het adenovirus infecteert het synoviale kapsel van het gewricht, waardoor de hierin aanwezige cellen IL37 zullen maken. Vervolgens zullen op maximaal vijf verschillende momenten in tijd, bijvoorbeeld dag 1, 3, 7, 14 en 28 weefsels verzameld worden voor histologie, wash-outs en RNA isolatie en vergeleken worden met niet adenovirus geïnjecteerde dag 0 samples. Wanneer we geen IL37 gen of eiwit spiegels kunnen detecteren in het weefsel en IL37 zorgt voor significant meer gewrichtsschade en kraakbeendepletie ten op zichte van de controle groep, hebben we een no-go moment en zullen de hieronder beschreven vervolgentoetsen niet worden uitgevoerd.

Het IL37-adenovirus dat we zullen injecteren in de muizen is uitvoerig getest *in vitro* met humane artrose kraakbeencellen en laat 48 h na transductie hoge IL37 expressie zien op zowel gen als eiwit niveau in vergelijking met het luciferase (Luc)-controle virus. Echter, we weten niet of dit virus hetzelfde expressiepatroon vertoont in een levend organisme en intact gewricht zoals in de muis. Aangezien het injecteren van het IL37-adenovirus de basis vormt voor onze experimentele artrosemodellen, zullen we met dit experiment meer inzicht krijgen in het expressieprofiel van

het IL37-adenovirus in de muis. De resultaten van dit experiment zijn van belang voor het optimaliseren van de timing en frequentie van de IL37-adenovirus injecties tijdens de experimentele artrosemodellen.

Na validatie van het IL37-adenovirus, gaan we verder met experimentele artrose modellen om het type artrose te bepalen waarbij IL37 een beschermend effect kan hebben op de progressie van kraakbeenschade. IL37 is beschreven als een stof, dat instaat is om de ontsteking te remmen. Dit hebben wij ook aangetoond in kraakbeencellen, waarbij IL37 in staat was om de IL1B-geïnduceerde ontsteking te remmen. Echter, wij hebben ook gezien dat IL37 zelf een direct effect heeft op kraakbeen zonder dat er ontsteking aanwezig is. Mogelijk beschermt IL37 dus ook niet alleen via reductie in ontsteking maar ook via de kraakbeenafbrekende enzymen. Om deze verschillende type artrose te onderzoeken, hebben we gekozen voor twee experimentele artrose modellen; het DMM-model (DAP2) en CiOA-model (DAP3). Doordat IL37 kan aangrijpen op twee verschillende aspecten van artrose (ontsteking en kraakbeenafbrekende enzymen) zullen het CiOA-model en DMM-model onafhankelijk van elkaar onderzocht worden en is er geen go/no go moment mogelijk.

Doelstelling 2: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het DMM-model (DAP 2).

In het DMM-model wordt gewrichtstrauma nagebootst door het menisco-tibiale ligament dat de meniscus aan de tibia verbindt door te snijden. Hierdoor kan de meniscus verschuiven en ontstaat er instabiliteit van het gewricht. Het is een lokaal model, waardoor je in het begin van het model kraakbeenschade ziet ontstaan op de plek waar de meniscus instabiel is en pas later wanneer het model langer loopt (rond de 8 weken) zie je kraakbeenschade ontstaan op andere plekken in het gewricht. In dit model, representatief voor traumaïnduceerde artrose, kunnen we onderzoeken of gewrichtstrauma gecombineerd met verhoogde IL37 spiegels zorgt voor minder kraakbeenschade. Dit model lijkt sterk op wat er bijvoorbeeld bij sporters gebeurt, wanneer ze een scheur oplopen in een ligament. Deze mensen ontwikkelen later vaak artrose.

Met behulp van het adenovirus raken we het synoviale kapsel van het gewricht, waardoor de hierin aanwezige cellen IL37 zullen produceren. Het vaak injecteren van het adenovirus kan eventueel leiden tot immuun reacties, dat ervoor zorgt dat de werking van het IL37 virus ongedaan wordt gemaakt.

Op basis van de resultaten die uit doelstelling 1 voort komen, bepalen we de timing en frequentie van adenovirus injectie in de artrose modellen.

In het DMM-model treedt de eerste zeer milde schade op rond 4 weken, te beginnen met minimale fibrillatie van het kraakbeen. Rond 8 weken begint de schade toe te nemen waardoor het significant verschillend is van de controle groep en op 16 weken is er duidelijk waarneembare artrose zowel aan de mediale zijde waar de meniscus dislocatie heeft opgetreden alsmede de laterale zijde van het gewricht.

In het DMM-model zullen we op twee verschillende momenten in het model het IL37-adenovirus of Luc-controle virus injecteren:

1. Start met injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het DMM-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 leidt tot minder en vertraagde inductie van kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na trauma al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.
2. Start met injectie van het IL37-adenovirus nadat er al echte gewrichtsschade aanwezig is in het DMM-model, bijvoorbeeld rond week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

- We hebben gekozen om het effect van IL37 op kraakbeenschade te onderzoeken in twee verschillende fases van het DMM-model, om inzicht te krijgen in welke fase mensen met traumaïnduceerde artrose nog gebaat kunnen zijn met een behandeling met IL37.

-

Doelstelling 3: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in in het CiOA-model (DAP 3)

In het CiOA-model wordt artrose geïnduceerd door injectie van collagenase, waardoor er laxiteit van de ligamenten ontstaat. Hierdoor wordt het gewricht in zijn geheel instabiel, wat gepaard gaat met veel ontsteking, in tegenstelling tot het DMM-model. Dit is geen focaal model, maar tast uiteindelijk alle kraakbeenvlakken aan. Door dit model te combineren met IL37-adenovirus injecties kunnen we bestuderen of artrose met ontsteking in aanwezigheid van IL37 zorgt voor minder kraakbeenschade.

In het CiOA-model treedt ontsteking op welke piekt tussen dag 3 en 7 na inductie van het model. De eerste (zeer milde) gewrichtsschade is zichtbaar rond 2 weken. Tussen de 3 en 4 weken is er matige schade zichtbaar en op 8 weken is er zeer duidelijk artrose aanwezig.

Net als in het DMM-model, zullen we ook in het CiOA-model op twee verschillende momenten in het model het IL37-adenovirus of Luc-controle virus injecteren:

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het CiOA-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 instaat is om de geïnduceerde ontsteking te temperen en leidt tot minder en vertraagde kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na inductie van ontsteking aan het gewricht, door bijvoorbeeld knieletsel, al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al beginnende schade zichtbaar is in het CiOA-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen in een artrose model met ontsteking. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. We hebben gekozen om het effect van IL37 op kraakbeenschade te onderzoeken in twee verschillende fases van het CiOA-model, om inzicht te krijgen in welke fase mensen met artrose gecombineerd met ontsteking nog gebaat kunnen zijn met een behandeling met IL37.

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

Voordat de experimentele artrosemodellen van start zullen gaan, zal er eerst een experiment uitgevoerd worden om het IL37-adenovirus te valideren in muizen. Hiermee kunnen we de optimale timing van de IL37-adenovirus injectie bepalen tijdens de experimentele artrosemodellen. De experimentele artrosemodellen zijn hiervan afhankelijk. Tegelijkertijd onderzoeken we in dit experiment of het IL37-adenovirus zelf geen schade aan het gewricht aanbrengt. In het onvoorziene geval dat er toch gewrichtsschade ontstaat als gevolg van injectie met het IL37-adenovirus in vergelijking met het Luc-controle virus dan hebben we een no-go moment en gaan we niet verder tot uitvoering van de experimentele artrosemodellen.

Na validatie van het IL37-adenovirus, gaan we verder met experimentele artrose modellen om het type artrose te bepalen waarbij IL37 een beschermend effect kan hebben op de progressie van kraakbeenschade. IL37 is beschreven als een stof, dat instaat is om de ontsteking te remmen. Dit hebben wij ook aangetoond in kraakbeencellen, waarbij IL37 in staat was om de IL1B-geïnduceerde ontsteking te remmen. Echter, wij hebben ook gezien dat IL37 zelf een direct effect heeft op kraakbeen zonder dat er ontsteking aanwezig. Mogelijk beschermt IL37 dus ook niet alleen via reductie in ontsteking maar ook via de kraakbeenafbrekende enzymen. Om deze verschillende type artrose te onderzoeken, hebben we gekozen voor twee experimentele artrose modellen; het DMM-model (DAP2) en CiOA-model (DAP3). Doordat IL37 kan aangrijpen op twee verschillende aspecten van artrose (ontsteking en kraakbeenafbrekende enzymen) zullen het CiOA-model (instabiliteits en onstekings-model) en DMM-model (trauma-geïnduceerde artrose) onafhankelijk van elkaar onderzocht worden en is er geen go/no go moment mogelijk.

In beide artrosemodellen zullen we op twee verschillende momenten van het artroseproces starten met de IL37-adenovirus injecties, vroeg na inductie van het artrose model (fase 1) en wanneer er al zichtbare gewrichtsschade is opgetreden (fase 2). Zo kunnen we bepalen in welke fase van het artroseproces IL37 beschermend is tegen kraakbeenschade. In deze twee fases zijn de artrose ontwikkelingen verschillend, in fase 1 zit je nog meer in de initiatie van het artroseproces, terwijl in fase 2 het vooral gaat om de progressie van de aanwezige artrose en schade. Doordat deze fases verschillend zijn, hebben de resultaten uit beide proeven geen voorspellende waarde voor elkaar. Hierdoor kunnen we geen go/no-go strategie toepassen en zullen we de twee experimenten afzonderlijk van elkaar uitvoeren.

Door het uitvoeren van de twee verschillende artrose modellen kunnen we vaststellen bij welk type artrose en in welke fase van het artrose proces IL37 beschermend is tegen gewrichtsschade, wat sterke aanwijzingen kan geven voor eventuele IL37 therapie voor artrosepatiënten.

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	Validatie van het IL37-adenovirus in muizen
2	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model
3	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het CiOA-model

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 Validatie van het IL37-adenovirus in muizen

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.

Binnen deze DAP willen we onderzoeken wat het expressieprofiel is van het door het IL37-adenovirus geproduceerde IL37 eiwit in muizen. Tegelijkertijd willen we onderzoeken of het IL37-adenovirus geen schade aanbrengt aan gewrichtsstructuren, gezien het feit dat muizen geen IL37 homoloog hebben. De kans hierop achten we echter zeer klein, omdat er in de literatuur studies zijn beschreven met IL37-transgene muizen die geen fenotype hebben en waarvan duidelijke anti-inflammatoire effecten beschreven zijn.

Om dit te onderzoeken zullen we muizen intra-articulair injecteren in de knie met het IL37-adenovirus of Luc-controle virus. Het Luc-controle virus wordt meegenomen om te corrigeren voor het virus effect. We zullen muizen daarna offeren op maximaal 7 tijdstippen om vast te stellen op welk moment na adenovirus injectie de hoogste IL37 expressie tot stand is gekomen en hoe lang deze spiegels aanhouden. Dit zal in eerste instantie dag 0 zijn en 1, 3, 7, 14, 21 en 28 dagen na injectie zijn, hetgeen aangepast zou kunnen worden naar aanleiding van voortschrijdend inzicht. Op dezelfde dagen kan worden gekeken of er gewrichtsschade heeft plaats gevonden door IL37 expressie.

Primaire uitkomstparameter: IL37 expressie in het gewricht in de tijd

Als primaire uitkomstparameter gebruiken we IL37 expressie in het gewricht. Hiertoe worden op maximaal zeven verschillende momenten in tijd gewrichten geïsoleerd voor histologie en wash-outs, om IL37 eiwit expressie aan te tonen in het weefsel en te bestuderen of het IL37 eiwit ook wordt uitgescheiden. Daarnaast wordt de IL37 expressie ook bestudeerd op RNA-niveau. Hiervoor worden de gewrichten geïsoleerd om hier vervolgens synovium en kraakbeen uit te verwijderen voor RNA-isolatie.

Secundaire uitkomstparameter: Gewrichtsschade/-parameters

In de weefsels die we isoleren voor onze primaire uitkomstparameter, kunnen we ook beoordelen of het IL37-adenovirus ernstige gewrichtsschade heeft toegebracht in vergelijking met het Luc-adenovirus. Op histologie kunnen we structurele gewrichtsveranderingen ten gevolge van de IL37 of Luc-adenovirus injectie vaststellen met behulp van de modificeerde OARSI (Osteoarthritis Research Society International) score [1]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van het kraakbeen alsmede de uitbreidbaarheid daarvan, zoals ontsteking.

Daarnaast zullen we ook markers voor kraakbeenschade op RNA-niveau bestuderen om de kwaliteit van het kraakbeen en synovium te beoordelen. Hiervoor zullen we onder andere kijken naar de productie van ontstekingsfactoren door zowel het synovium als kraakbeen zoals, IL1 β , IL6 en IL8, en de productie van matrix afbrekende enzymen zoals MMPs en ADAMTSs.

Referenties:

Pritzker K, Gay S. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006 15(1):13-29

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

Muizen worden onder anesthesie eenmaal eenzijdig intra-articulair geïnjecteerd met het IL37-adenovirus of Luc-controle virus. De andere knie zal niet worden gebruikt als interne controle, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten. Daarom is besloten om aparte muizen mee te nemen voor de Luc-adenovirus injecties. Het experiment zal maximaal 28 dagen duren, waarbinnen vervolgens op maximaal 7 verschillende momenten in tijd na adenovirus injectie monsters verzameld worden voor histologie, wash-outs en RNA isolatie om de IL37 expressie in tijd te volgen en te bestuderen of het IL37-adenovirus geen gewrichtsschade veroorzaakt. Dit zal in eerste instantie dag 0 zijn en dag 1, 3, 7, 14, 21 en 28 dagen na injectie.

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) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt 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 onnodige hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarden van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde. De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (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. Omdat muizen van zichzelf geen IL37 tot expressie brengen, gaan we uit van een groot verschil tussen de Luc en IL37 adenovirus geïnjecteerde gewrichten en verwachten we een normale spreiding. Er kan echter wel variatie ontstaan in de hoogte van de IL37 expressie tussen de muizen en het expressiepatroon tussen de muizen. Uitgaande van een SD van 25 en een verschil tussen Luc en IL37 geïnjecteerde gewrichten van 40%, komt dat neer op $n = 7.1$, afgerond 8 muizen per groep.

Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door mogelijke systemische effecten. Daarom is besloten tot aparte controle muizen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

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

We willen de C57Bl/6 muizen gebruiken en het expressiepatroon van het IL37-adenovirus bestuderen in vrouwtjes muizen. We kiezen ervoor om het expressiepatroon van het IL37-adenovirus te bestuderen in **zowel vrouwtjes als mannetjes** muizen. **We hebben gekozen voor beide geslachten omdat we niet geheel zeker zijn of het expressiepatroon van het IL37-adenovirus hetzelfde zal zijn in beide geslachten.** In DAP2 (bijlage 3.4.4.3) wordt gebruik gemaakt van mannelijke dieren en in DAP3 (bijlage 3.4.4.3) wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren. De validatie experimenten van DAP1 (bijlage 3.4.4.1) zijn van groot belang voor de vervolggexperimenten in DAP2 en DAP3, omdat we deze methode willen toepassen in de experimentele artrosemodellen. Door het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in beide geslachten te onderzoeken kunnen we met zekerheid het juiste expressiepatroon bepalen voor de vervolggexperimenten in de experimentele artrosemodellen van DAP2 en DAP3. Tevens kunnen we uitsluiten dat er verschillen zijn tussen het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. Mochten er inderdaad verschillen aanwezig zijn in het expressiepatroon van het IL37-adenovirus tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, kunnen we onze vervolggexperimenten in DAP2 en DAP3 optimaliseren aan de hand van de resultaten verkregen uit deze experimenten van DAP 1 (bijlage 3.4.4.1) voor zowel vrouwelijke als mannelijke dieren.

In experiment zullen we twee experimenten uitvoeren, hierdoor hebben we een globale fasering aangebracht. Eerst onderzoeken we via RNA samples en wash-outs of IL37 goed tot expressie wordt gebracht op gen en eiwit niveau. Mocht het adenovirus goed tot expressie komen, dan hebben we een go moment en zullen we vervolgens via histologie gaan kijken of het adenovirus zelf geen schade aanbrengt aan het gewricht. Mochten we er achter komen dat het IL37-adenovirus niet tot expressie komt, dan hebben we een no go moment en hoeven we ook geen experiment in te zetten voor histologie.

Age range: Jong-volwassen muizen, 10-14 weken oud.

Origin: Gecertificeerde leverancier, zoals Janvier, Jackson of Charles River

Estimated number of animals: Voor dit experiment hebben we maximaal **624** muizen nodig, gebaseerd op **twee geslachten (mannelijke en vrouwelijke dieren)** een maximum van 1x dag 0 controle groep met drie verschillende uitkomstparameters (histologie, wash-outs en RNA), vervolgt door 2 experimentele groepen (1: Luc-controle en 2:IL37-adenovirus behandelde groep) en per groep een schatting van 8 muizen per groep met 3

verschillende uitkomstparameters (histologie, wash-outs en RNA) op maximaal 6 verschillende tijdstippen. Voor histologie hebben we het gehele kniegewricht van de muis nodig en voor de andere twee uitkomstmaten (wash-outs en RNA) hebben we zowel het synovium als kraakbeen nodig om de schade te bestuderen. Hierdoor is het niet mogelijk om de verschillende uitkomstmaten binnen hetzelfde dier te meten.

Species: C57Bl/6

Origin: Gecertificeerde leverancier

Maximum number of animals: 624

Life stage: 10-14 weken

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6	Gecertificeerde leverancier	624	10-14 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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

In onze *in vitro* experimenten hebben we aangetoond dat het IL37-adenovirus de hoogste expressie spiegels laat zien 2-3 dagen na transductie van humane kraakbeencellen. De expressielevels verlagen tot baseline binnen 2-4 weken na transductie. Het expressieprofiel van het IL37-adenovirus *in vitro* hebben we goed in kaart gebracht, maar we weten niets over het expressieprofiel van het IL37-adenovirus in een levend organisme en een intact gewricht. Daarnaast is *in vivo* het immuunsysteem aanwezig en is er interactie tussen verschillende weefsels van het gewricht die het expressieprofiel van het IL37-adenovirus kunnen beïnvloeden. Verder weten we ook niet hoe de muizen op het IL37-adenovirus zullen reageren, aangezien muizen zelf geen IL37 homoloog hebben en weten we niet of het adenovirus schade aanbrengt aan het gewricht. Wel weten we vanuit de literatuur dat IL37-transgene muizen geen fenotype laten zien en de muizen sterk op IL37 reageren door de ontsteking te verminderen. Omdat we maar weinig weten over het IL37-adenovirus in muizen en in een intact gewricht, is het nodig om eerst het IL37-adenovirus te valideren in muizen en zijn *in vitro* experimenten niet heel voorspelbaar. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren met eenzelfde gewrichtspathologie en immuunsysteem als mensen en zijn daarom het beste model om te gebruiken.

Reduction

In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Per experiment wordt nauwkeurig bepaald of alle groepen noodzakelijk zijn om antwoord te krijgen op de vraag. In dit experiment zal bepaald worden of onze experimentele opzet die we willen toepassen in de experimentele artrosemodellen een geschikte methode is. Dit zorgt ervoor dat we zeker weten dat het IL37-adenovirus functioneel is en veilig gebruikt kan worden zonder dat het van zichzelf al schade aanricht aan het gewricht. Met deze resultaten kunnen er valide metingen gedaan worden in de experimentele artrosemodellen, waardoor voorkomen wordt dat er onnodige dieren gebruikt zullen worden in vervolg experimenten. Via de power-berekeningen zijn de groepsgroottes bepaald, en deze experimentele groepen zijn nodig om een valide antwoord te krijgen op de onderzoeksvraag. Een verdere reductie in groepsgrootte zal geen betrouwbare data opleveren en is daarom niet mogelijk. Voor het expressiepatroon van het IL37-adenovirus en Luc-adenovirus kijken we op zeven tijdstippen in de tijd naar de hoogte van de IL37 expressie levels en bestuderen we of het IL37-adenovirus schade aanbrengt aan het gewricht ten opzicht van de Luc-adenovirus. Gewrichtsschade wordt bestudeerd via drie uitkomstparameters: histologie, RNA en wash-outs. Voor iedere uitkomstmaat is synovium en kraakbeen nodig, waardoor we de verschillende uitkomstparameters niet in 1 dier kunnen onderzoeken.

Refinement

Om het IL37-adenovirus te valideren is het niet nodig om al artrose te induceren in de muizen. Daarom zullen er naïeve muizen gebruikt worden om het Luc-controle of IL37-adenovirus te injecteren. De injectie van de adenovirussen vindt plaats onder adequate verdoving en extra comfort zal geboden worden door het verstrekken van zacht nestmateriaal tijdens het herstel van de anesthesie. Verder zal dit experiment meehelpen met het verder verfijnen van vervollexperimenten. Dagelijkse inspecties van de muizen zullen ervoor zorgen dat muizen met onverwacht ongemak juist behandeld zullen worden of waar nodig uit het experiment worden gehaald om verder ongemakken en of pijn te voorkomen.

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

De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De adenovirus injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

In dit dierenexperiment wordt de kinetiek en basale effecten van het IL37-adenovirus bestudeerd in de muis. We gebruiken hiervoor naïve muizen, dus we passen geen artrose model toe. Verder zullen de muizen hiervoor eenmalig een adenovirus toegediend krijgen en is het een kortlopend experiment. Omdat we niet verwachten dat het IL37-adenovirus ongerief zal aanbrengen aan de muis, passen we geen maatregelen toe om negatieve effecten te minimaliseren.

In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

G. Location where the animals procedures are performed

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.

Intra-articulaire injecties zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie.

We verwachten dat de pijn na de adenovirus injectie zeer kort en lokaal is dat pijnbestrijding na de injectie niet noodzakelijk is.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

De muizen zullen licht ongerief ondervinden door de intra-articulaire injecties onder anesthesie .

Explain why these effects may emerge.

Het zou eventueel kunnen dat injectie van het adenovirus een lichte ontsteking veroorzaakt, dit zou kunnen zorgen voor verminderde mobiliteit. Echter, wij verwachten geen schadelijke effecten van de adenovirus injecties.

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

We hebben geen preventieve maatregelen om ongemakken van de muizen te voorkomen, aangezien de misschien bijkomstige ontsteking ten gevolge van de adenovirus injecties een uitleesparameter is. Wel hebben we de algemene humane eindpunten. Verder indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef genomen worden, dit komt echter zeer zelden voor.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We hanteren de algemene humane eindpunten. Verder indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef genomen worden, dit komt echter zeer zelden voor. Humane eindpunten zijn derhalve: ziekteverschijnselen en zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humane eindpunt is zeer klein. Naar alle waarschijnlijkheid kleiner dan 1%.

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).

Het verwachte niveau van discomfort is licht voor alle dieren geïncludeerd in deze DAP.

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.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model
Serial number	Type of animal procedure					
2	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model					

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.

In het DMM-model wordt het ligament in de rechter knie dat de meniscus aan de mediale zijde met de tibia verbindt doorgesneden, dit zorgt voor instabiliteit van de meniscus en de gehele knie. In week 10-16 ontstaat er kraakbeenschade door gewrichtsinstabiliteit. Dit is een artrosemodel met beperkte ontsteking.

Met behulp van het IL37-adenovirus, dat intra-articulair in de knie wordt geïnjecteerd, raken we cellen in het synovium, die vervolgens tijdelijk IL37 gaan produceren. Het IL37 of Luc-controle virus zal 2-3 keer intra-articular worden ingespoten, afhankelijk van het expressieprofiel van het adenovirus (DAP 1). Hierbij zal het adenovirus worden geïnjecteerd in twee afzonderlijke experimenten in verschillende fasen van het artroseproces in het DMM-model.

- Experiment 1: Injectie van het IL37-adenovirus kort na inductie van het DMM-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 in staat is om al vroeg in het artroseproces de ernst van kraakbeenschade te remmen, te vertragen of zelfs te voorkomen
- Experiment 2: Injectie van het IL37-adenovirus wanneer er gewrichtsschade is opgetreden in het DMM-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen.

Bovenstaande beschreven experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin het IL37-adenovirus vroeg in het model geïnjecteerd wordt, bestuderen we of artrose patiënten waarbij nog maar kort artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben op de initiatie van kraakbeenschade. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we het effect van IL37 wanneer er al voor een langere tijd artrose aanwezig is en daarmee ook al meer kraakbeenschade heeft plaatsgevonden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen. In deze twee fasen van hetzelfde artrosemodel vinden verschillende processen plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we geen go/no go moment invoegen.

De primaire uitkomstparameter is: kraakbeenschade/kraakbeenschade-parameters

Voor het bestuderen van het effect van IL37 op kraakbeenschade in het DMM-model, zullen de muizen op verschillende tijdstippen na het inzetten van de proef geofferd worden. Er zullen weefsels geïsoleerd worden voor histologie, RNA en wash-outs. Op histologie kunnen we structurele veranderingen aan het gewricht vaststellen met behulp van de gemodificeerde OARSI score [1]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen, zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van kraakbeen alsmede de uitgebreidheid daarvan. Op RNA niveau kunnen we de kwaliteit van het kraakbeen bestuderen op productie van ontstekingsmarkers zoals IL1 β , IL6 en IL8 en matrix afbrekende enzymen zoals matrix metalloproteinasen (MMPs) en a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs (ADAMTSs).

Wash-outs zullen worden verkregen door het weefsel uit het gewricht in kweek te zetten, waardoor ze signaalmoleculen, zoals ontstekingsfactoren of matrix afbrekende enzymen, zullen uitscheiden wat ze normaal ook in het gewricht zouden hebben gedaan. Door dit materiaal te verzamelen kunnen we de kraakbeenafbrekende processen op eiwitniveau bestuderen bijvoorbeeld met behulp van de Multiplex Elisa (Luminex).

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

In het DMM-model wordt in de rechter knie het ligament waarmee de mediale meniscus in de knie aangehecht zit aan het bot doorgesneden onder volledige anesthesie. In dit model zal er eerst kraakbeenschade optreden aan de mediale zijde en later in het model ook de laterale zijde. Dit model zal 20 weken duren. Op basis van ervaring uit eerdere experimenten met DMM-modellen weten we dat 20 weken voldoende zijn om kraakbeenschade te induceren.

Binnen het DMM-model zullen we twee experimenten uitvoeren.

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het DMM-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 leidt tot minder en vertraagde inductie van kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na trauma al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1, waarin we bestuderen hoe lang de IL37 levels aanwezig blijven in het gewricht. Maximale frequentie van injectie is 10 keer om immunoreacties te voorkomen.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al echte gewrichtsschade aanwezig is in het DMM-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

In beide experimenten zal er op drie korte tijdstippen, vlak na injectie van het IL37 adenovirus of Luc adenovirus weefsels worden geïsoleerd (bijvoorbeeld dag 1, 3 en 7) om te bevestigen dat de IL37 overexpressie is gelukt en om te kijken naar de ontsteking. Daarnaast zal er op vier latere tijdstippen weefsel worden geïsoleerd om het effect van IL37 op gewrichtsschade te bestuderen tot maximaal 20 weken. Voor experiment 1 zal dit bijvoorbeeld rond week 4, 8, 16 en 20 zijn; en voor experiment 2 zal dit bijvoorbeeld week 8, 10, 16 en 20 zijn.

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) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt 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 gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$.

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde. De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (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.

Uitgaande van eerdere experimenten met het DMM-model en de variatie tussen de read-out parameters gaan we uit van een standaard deviatie van 15 en een verschil van 20%, wat neerkomt op een n-waarde van 9,8. Dus afgerond 10 muizen per groep. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit mogelijk een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten.

Daarom is besloten tot aparte controle muizen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Species: Kraakbeen is een zeer complex weefsel dat interacties aangaat met andere weefsels in het gewricht, zoals het synovium en functioneert onder invloed van belasting. Onderzoek naar kraakbeen kan daarom het beste uitgevoerd worden in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een vergelijkbaar functionerend gewricht als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een vergelijkbare interactie tussen de weefsels in het gewricht als de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem en zijn daarom het beste geschikte model om artrose in te onderzoeken.

We zullen gebruik maken van de C57Bl/6 muizen en geven de voorkeur aan mannelijke muizen. De OA pathologie tussen mannetjes en vrouwtjes muizen is hetzelfde, hierdoor gelden de conclusies die getrokken worden uit de experimenten uitgevoerd in het mannelijk geslacht ook voor het vrouwelijk geslacht. **Argumentatie om dit model uit te voeren in mannelijke muizen komt voort uit de literatuur. In de literatuur is in 2007 het volgende artikel verschenen van Glasson SS *et al.*: "Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model" (Osteoarthritis and Cartilage, 2007). In deze studie wordt laten zien dat mannelijke muizen significant 'more severe' artrose ontwikkelen dan vrouwelijke muizen op alle tijdpunten van het zogeheten DMM-model. Mannelijke muizen laten hierbij extensieve fibrillatie zien, tidemark erosie en verlies van proteoglycanen, terwijl de effecten van dit model in vrouwelijke muizen zich beperken tot oppervlakkige fibrillatie en lokaal proteoglycaan verlies. De vrouwelijke muizen van verschillende strains laten sterke bescherming zien tegen dit artrosemodel, waardoor artrose zich niet of met mate ontwikkelt. Hierdoor is het moeilijk het effect van IL37, waarvan we verwachten dat het een beschermend effect heeft op artrose, te onderzoeken op het moment dat er bijna geen artrose plaatsvindt. Verder wordt de keuze voor het DMM-model in mannelijke muizen ondersteund vanuit de literatuur. Recent gepubliceerde studies waarin het DMM-model is toegepast door verschillende onafhankelijke onderzoeksgroepen, zijn allemaal uitgevoerd in mannelijke muizen. Voorbeelden van deze publicaties zijn:**

1. Rachel E. Miller, Shingo Ishihare *et al.* Chemogenetic inhibition of pain neurons in a mouse model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017
2. Oscar Alvarez-Garcia, Tokio Matsuzaki *et al.* Regulated in development and DNA Damage Response 1 Deficiency impairs autophagy and mitochondrial biogenesis in articular cartilage and increases the severity of experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017.
3. P. Das Neves Borges, T. Vincent *et al.* Automated assessment of bone changes in cross-sectional micro-CT studies of murine experimental osteoarthritis. *PloS One*, 2017.
4. Averi Gibson, Carrie Mingalone *et al.* Wnt7a inhibits IL-1 β induced catabolic gene expression and prevents articular cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Scientific Reports*, 2017.
5. F Veronesi, G Giavaresi *et al.* Chondroprotective activity of N-acetyl phenylalanine glucosamine derivative on knee joint structure and inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.

6. Miotla Zarebska, Chanalaris A *et al.* CCL2 and CCR2 regulate pain-related behavior and early gene expression in post-traumatic murine osteoarthritis but contribute little to chondropathy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
7. A Latourte A, C Cherifi *et al.* Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
8. W Choi and J Chun. Upregulation of lipocalin-2 (LCN2) in osteoarthritic cartilage is not necessary for cartilage destruction in mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
9. Neng-Yu Lin, Alfiya Distler *et al.* Inhibition of Notch1 promotes hedgehog signaling in a HES1-dependent manner in chondrocytes and exacerbates experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
10. NH Lim, TL Vincent *et al.* In vivo optical imaging of early osteoarthritis using an antibody specific to damaged arthritis cartilage. *Arthritis Research and Therapy*, 2015.

Gebaseerd op de studie uit 2007 van Glasson *et al.* die aantoont dat de DMM-artrose maar matig ontwikkelt in vrouwelijke muizen en de recente publicaties die zijn verschenen waarin het DMM-model alleen uitgevoerd is in mannelijke muizen, hebben we besloten om onze experimenten beschreven in DAP2 (bijlage 3.4.4.2) alleen uit te voeren in mannelijke muizen. Hierdoor voorkomen we dat we onnodig veel muizen hoeven te gebruiken, die wetenschappelijk gezien geen extra inzicht zouden geven in het effect van IL37 op de experimentele artrose geïnduceerd door het DMM-model, door het ontbreken van een therapeutisch window. Door het gebruik van mannelijke muizen is de variatie binnen de groepen kleiner dan wanneer we vrouwelijke muizen zouden gebruiken, waardoor we minder grote groepen muizen nodig hebben om een significant resultaat te kunnen behalen, wat we ethisch verantwoord vinden. Wel weten we dat mannelijke muizen eerder de neiging hebben om te vechten dan vrouwelijke muizen. Hiermee is rekening gehouden in de berekening van de grootte van de experimentele groepen. Verder worden er maatregelen getroffen om de kans op vechten te minimaliseren, zoals voorkomen dat de muizen herverdeeld worden en er wordt gebruik gemaakt van lavendelspray. We hopen hiermee zo optimaal mogelijk te voldoen aan vermindering en verfijning.

Age range: Jong-volwassen muizen, 10-14 weken oud.

Origin: Gecertificeerde leverancier zoals Janvier, Jackson of Charles River

Estimated number of animals: Maximaal 882 muizen gebaseerd op de twee experimenten die we in het DMM-model zullen uitvoeren, met in ieder experiment twee experimentele groepen (1: Luc-controle en 2: IL37-adenovirus behandelde groep) en per groep een schatting van 10 muizen per groep, voor ieder van de 3 verschillende read-out parameters (Histologie, RNA, wash-outs) op maximaal 7 verschillende tijdstippen.

In verband met mogelijke uitval in dit experiment voegen we 5% extra muizen toe (42 muizen), wat komt op een totaal van 882 muizen.

Deze uitval kan optreden door het risico van narcose. In enkele experimenten in het verleden is het wel eens voorgekomen dat 1 a 2 muizen overleden tijdens en na narcose. Dit was ongeveer 5% van de totale hoeveelheid gebruikte muizen.

Species: C57Bl/6

Origin: Gecertificeerde Leverancier

Maximum number of animals: 882

Life stage: 10-14 weken

Referentie:

1. Ma HL et al. Osteoarthritis is sex dependent in a surgical mouse model. Osteoarthritis and Cartilage 2007. 15(6):695-700

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6	Gecertificeerde Leverancier	882	10-14 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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Artrose is een proces waarin een samenspel plaatsvindt tussen de verschillende weefsels in het gewricht. Daarom zijn *in vitro* experimenten niet het meest geschikte model om het proces van artrose te bestuderen. Kraakbeenschade wordt namelijk beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Daarnaast is het kraakbeen ook afhankelijk van belasting, die bijvoorbeeld ontstaat bij beweging. Zonder beweging worden signaalroutes uitgeschakeld, die het kraakbeen normaal gesproken in stand houden. Daarom is er op dit moment helaas geen alternatief voor het bestuderen van artrose. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren die artrose in het gewricht ontwikkelen op een vergelijkbare manier als de mens en waarin het proces van kraakbeenschade dus ook het beste bestudeerd kan worden.

Reduction

In dit project is er gebruik gemaakt van een power-berekening om het juiste aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren te berekenen. Per experiment wordt er nauwkeurig gekeken of alle groepen noodzakelijk zijn om antwoord te geven op de vraag. De beschreven experimenten en tijdstippen kunnen worden aangepast afhankelijk van het experiment waarin we het expressieprofiel van het IL37-adenovirus gaan bestuderen. Dit zou kunnen leiden tot minder tijdstippen waarop weefsels geïsoleerd moeten worden. Op basis van de power-berekening, is dit aantal muizen echt nodig om valide antwoorden te krijgen op onze onderzoeksvraag. Een verder verminderde van het aantal muizen, is dus niet verantwoord.

Refinement

Het DMM-model zal artrose induceren in het gewricht van de muizen, waardoor de muizen mogelijk pijn zullen ervaren. Pijn is een functioneel aspect van artrose en zal invloed hebben de belasting van het gewricht en daarmee ook op het ontstaan van de pathologie. Gezien de bijdrage van ontsteking aan het artroseproces zijn middelen die ontsteking beïnvloeden onverenigbaar met de proef.

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

De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De operatie en injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast. In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 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.

Inductie van de artrosemodellen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie. Pijnbestrijding zal plaatsvinden intra-operatief en er zal ook pijnbestrijding plaats vinden tot maximaal twee dagen na operatie. Ook de intra-articulaire injecties met de adenovirussen zullen plaats vinden onder volledige anesthesie. Tijdens de ontwikkeling van artrose zal er geen pijnbestrijding plaats vinden, omdat dit effect kan hebben op het verloop van het artroseproces.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Muizen kunnen matig ongerief oplopen door (de injecties onder) anesthesie en operatie. Verder zullen ze matig ongerief ondervinden door de artrose die ze zullen ontwikkelen, waardoor er een geringe kans is dat de muis door de artrose de aangedane poot niet goed meer kan belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

Explain why these effects may emerge.

Het kan zijn dat de muis ongerief ondervindt ten gevolge van (wakker worden uit) anesthesie. De oorzaak van het ongerief is de artrose die zal ontwikkelen, hierdoor is de kans aanwezig dat de muis de aangedane poot minder zal belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

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

We hebben geen preventieve maatregelen, omdat het essentieel is dat de muizen artrose ontwikkelen. Wel hebben we humane eindpunten. Indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef worden genomen, dit komt echter zeer zelden voor. Om pijn tijdens behandelingen te voorkomen zal er volledige anesthesie worden toegepast bij bijvoorbeeld intra-articulaire injecties en operaties.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We hanteren de algemene humane eindpunten. Verder als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont, zal de muis uit de proef worden gehaald. Humane eindpunten zijn: ziekteverschijnselen en zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

Het verwachte level van ongerief is matig voor alle dieren.

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 weefsels te kunnen isoleren 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 Effect van IL37 op gewrichtsschade in het CiOA-model

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.

In het CiOA-model wordt schade aan ligamenten aangebracht, door maximaal 3x intra-articulair collagenase te injecteren in de rechterknie. Dit zorgt ervoor dat het gewricht instabiel wordt er schade optreedt. Het grote verschil met het DMM-model is dat er bij het CiOA-model een grote ontstekingscomponent betrokken is. Na offeren zal weefsel geïsoleerd worden om kraakbeenschade vast te stellen.

Met behulp van het IL37-adenovirus raken we cellen in het synovium, die vervolgens IL37 gaan produceren. Het IL37 of Luc-controle adenovirus zal 2-3 keer inter-articulair worden ingespoten, afhankelijk van het expressie profiel van het adenovirus (DAP 1). Hierbij zal het adenovirus in twee afzonderlijke experimenten in verschillende fasen van het artrose proces in het CiOA-model.

- Experiment 1: Injectie van het IL37- of Luc-adenovirus kort na inductie van het CiOA-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 in staat is om al vroeg in het artroseproces de ernst van kraakbeenschade te remmen, te vertragen of zelfs te voorkomen
- Experiment 2: Injectie van het IL37 of Luc adenovirus wanneer er zichtbare gewrichtsschade is opgetreden in het CiOA-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen.

Bovenstaande beschreven experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin het IL37-adenovirus vroeg in het model geïnjecteerd wordt, bestuderen we of artrose patiënten waarbij nog maar kort artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben op de initiatie van kraakbeenschade. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we het effect van IL37 wanneer er al voor een langere tijd artrose aanwezig is en daarmee ook al meer kraakbeenschade heeft plaatsgevonden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen. In deze twee fasen van hetzelfde artrosemodel vinden verschillende processen plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we geen go/no go moment invoegen.

De primaire uitkomstparameter is: kraakbeenschade

Voor het bestuderen van het effect van IL37 op kraakbeenschade in het CiOA-model, zullen de muizen op verschillende tijdstippen na het inzetten van de proef geofferd worden. Er zullen weefsels geïsoleerd worden voor histologie, RNA en wash-outs. Op histologie kunnen we structurele veranderingen aan het gewricht vaststellen met behulp van de gemodificeerde OARSI score [1]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen, zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van kraakbeen alsmede de uitgebreidheid daarvan. Op RNA niveau kunnen we de kwaliteit van het kraakbeen bestuderen op productie van ontstekingsmarkers zoals IL1 β , IL6 en IL8 en matrix afbrekende enzymen zoals matrix metalloproteinases (MMPs) en a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs).

Wash-outs zullen worden verkregen door het weefsel uit het gewricht een bepaalde tijd in kweek te zetten, waardoor ze signaalmoleculen, zoals ontstekingsfactoren of matrix afbrekende enzymen, zullen uitscheiden wat ze normaal ook in het gewricht zouden hebben gedaan. Door dit materiaal te verzamelen kunnen we de kraakbeenafbrekende processen op eiwitniveau bestuderen, bijvoorbeeld met behulp van de Luminex.

Pritzker K, Gay S. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006 15(1):13-29

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

Bij het CiOA-model wordt er maximaal 3x intra-articulair collagenase ingespoten in de rechterknie onder isofluraan voor anesthesie. Het aantal injecties wordt bepaald naar aanleiding van de artrose die gemeten is in de meest recente uitvoering van het CiOA-model en de daarbij gebruikte dosis. Het slapper worden van de ligamenten zorgt ervoor dat het gewricht instabiel wordt en er ontsteking optreedt die vergelijkbaar is met humane artrose met ontsteking. Rond week 6-8 ontstaat er kraakbeenschade.

Binnen het CiOA-model zullen we twee experimenten uitvoeren.

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het CiOA-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 instaat is om de geïnduceerde ontsteking te temperen en leidt tot minder en vertraagde kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na inductie van ontsteking aan het gewricht, door bijvoorbeeld knieletsel, al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit DAP 1.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al beginnende schade zichtbaar is in het CiOA-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen in een artrose model met ontsteking. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al beginnende schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit DAP 1.

In beide experimenten zal er op drie korte tijdstippen, vlak na injectie van het IL37 adenovirus of Luc adenovirus weefsels worden geïsoleerd (bijvoorbeeld dag 1, 3 en 7) om te bevestigen dat de IL37 overexpressie is gelukt en om te kijken naar de ontsteking. Daarnaast zal er op vier latere tijdstippen weefsel worden geïsoleerd om het effect van IL37 op gewrichtsschade te bestuderen tot maximaal 20 weken. Voor experiment 1 zal dit bijvoorbeeld rond week 4, 8, 16 en 20 zijn; en voor experiment 2 zal dit bijvoorbeeld week 8, 10, 16 en 20 zijn.

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) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt 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 gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$.

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde. De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (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.

Uitgaande van eerdere experimenten met CiOA-model gaan we uit van een standaard deviatie van 15 en een verschil van 20%, wat neerkomt op een n-waarde van 9,8. Dus afgerond 10 muizen per groep. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken,

aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten. Daarom is besloten tot aparte controle muizen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Species: Kraakbeen is een zeer complex weefsel dat interacties aangaat met andere weefsels in het gewricht, zoals het synovium en functioneert onder invloed van belasting. Onderzoek naar kraakbeen kan daarom alleen uitgevoerd worden in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een vergelijkbaar functionerend gewricht als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een vergelijkbare interactie tussen de weefsels in het gewricht als de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem en zijn daarom het beste geschikte model om artrose in te onderzoeken.

We zullen gebruik maken van de C57Bl/6 muizen en geven de voorkeur aan vrouwelijke muizen. De OA pathologie tussen het mannelijk en vrouwelijk geslacht zijn hetzelfde. Hierdoor gelden conclusies die we verkrijgen uit de experimenten met het vrouwelijke geslacht ook voor het mannelijke geslacht.

Echter, uit eigen ervaring van onze diermodellen en gebaseerd op de literatuur is bekend dat mannelijke muizen vaker vechten. In 2013 is een publicatie verschenen van Meakin Lee *et al.*, genaamd: "Male mice housed in groups engage in frequent fighting and show a lower response to additional bone loading than females or individually housed males that do not fight" (Bone, 2013). In deze publicatie hebben ze de observatie gedaan dat mannelijke muizen betrokken zijn bij gevechten 1.3 keer per uur, terwijl vrouwelijke muizen niet vechten. Het vechten van de mannelijke muizen heeft hun onderzoeksresultaten beïnvloedt. Wat wij ervaren hebben uit onze dierexperimenten, is dat het vechten van mannelijke muizen resulteert in veel dislocaties van het kniegewricht. Wanneer er dislocaties optreden, is het niet verantwoord om de muizen in het experiment te laten, waardoor we de muizen vanwege ethische redenen uit het experiment halen. Hierdoor bestaat de kans dat de grote van onze muizengroepen te klein wordt om een statistisch significant resultaat te behalen. Verder is het beleid dat wanneer de muizen vechten, de vechter apart moet worden gezet wat weer invloed heeft op de ontwikkeling van artrose.

Wanneer we mannelijke muizen zouden gebruiken zouden we veel muizen vroegtijdig uit onze experimenten moeten halen vanwege de dislocaties, waardoor we vanaf het begin grote experimentele groepen van muizen nodig hebben om nog betrouwbare conclusies te kunnen trekken uit onze resultaten. Vanwege het hoge aantal mannelijke muizen dat we voor dit model nodig zouden hebben en het ongerief dat dit met zich meebrengt, hebben we gekozen voor optimale verfijning van het experiment en besloten om DAP3 (bijlage 3.4.4.3) alleen in vrouwelijke muizen uit te voeren.

Age range: Jong-volwassen muizen, 10-14 weken muizen.

Origin: Gecertificeerde leverancier zoals Janvier, Jackson of Charles River

Estimated number of animals: Maximaal 882 muizen gebaseerd op de twee experimenten die we in het CiOA-model zullen uitvoeren, met in ieder experiment twee experimentele groepen (1: Luc-controle en 2: IL37-behandelde groep) en per groep een schatting van 10 muizen per groep, voor ieder van de 3 verschillende read-out parameters (Histologie, RNA, wash-outs) op maximaal 7 verschillende tijdstippen.

In verband met mogelijke uitval in dit experiment voegen we 5% extra muizen toe (42 muizen), wat komt op een totaal van 882 muizen. Deze uitval is gebaseerd op patella dislocaties die kunnen optreden bij dit model. Dit percentage is gebaseerd op een eerder experiment waarbij in de collagenase behandelde groep muizen dislocaties optraden. Dit was ongeveer 5% van de totale hoeveelheid gebruikte muizen.

Species: C57Bl/6

Origin: Gecertificeerde Leverancier

Maximum number of animals: 882

Life stage: 10-14 weken

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6	Gecertificeerde Leverancier	882	10-14 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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Artrose is een proces waarin een samenspel plaatsvindt tussen de verschillende weefsels in het gewricht. Daarom zijn *in vitro* experimenten niet het meest geschikte model om het proces van artrose te bestuderen. Kraakbeenschade wordt namelijk beïnvloedt door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Daarnaast is het kraakbeen ook afhankelijk van belasting, die bijvoorbeeld ontstaat bij beweging. Zonder beweging worden signaalroutes uitgeschakeld, die het kraakbeen normaal gesproken in stand houden. Daarom is er op dit moment helaas geen alternatief voor het bestuderen van artrose. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren die artrose in het gewricht ontwikkelen op een vergelijkbare manier al de mens en waarin het proces van kraakbeenschade dus ook het beste bestudeerd kan worden.

Reduction

In dit project is er gebruik gemaakt van een power-berekening om het juiste aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren te berekenen. Per experiment wordt er nauwkeurig gekeken of alle groepen noodzakelijk zijn om antwoord te geven op de vraag. De beschreven experimenten en tijdstippen kunnen worden aangepast afhankelijk van het experiment waarin we het expressieprofiel van het IL37-adenovirus gaan bestuderen. Dit zou kunnen leiden tot minder tijdstippen waarop weefsels geïsoleerd moeten worden. Op basis van de power-berekening, is dit aantal muizen echt nodig om valide antwoorden te krijgen op onze onderzoeksvraag. Een verder verminderde van het aantal muizen, zou kunnen leiden tot herhaling van experimenten waardoor er juist weer extra muizen gebruikt zouden moeten worden.

Refinement

Het CiOA-model zal artrose induceren in het gewricht van de muizen, waardoor de muizen pijn zullen ervaren. Pijn is een functioneel aspect van artrose en zal invloed hebben op de belasting van het gewricht en daarmee ook op het ontstaan van de pathologie. Gezien de bijdrage van ontsteking aan het artroseproces zijn middelen die ontsteking beïnvloeden onverenigbaar met de proef.

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

De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 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.

Inductie van de artrosemodellen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie, verder zal er geen analgesie worden toegepast. Ook de intra-articulaire injecties met de adenovirussen zullen plaats vinden onder volledige anesthesie. Tijdens de ontwikkeling van artrose zal er geen pijnbestrijding plaats vinden, omdat dit effect kan hebben op het verloop van het artrose proces.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Muizen kunnen matige ongerief oplopen door de injecties van de anesthesie. Verder zullen ze matig ongerief ondervinden door de artrose die ze zullen ontwikkelen, waardoor er een geringe kans is dat de muis door de artrose de aangedane poot niet goed meer kan belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

Explain why these effects may emerge.

Er zal ongerief zijn door ontwaken uit anesthesie. De oorzaak van het ongerief is de artrose die zal ontwikkelen, hierdoor is de kans aanwezig dat de muis de aangedane poot minder zal belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

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

Er zullen geen preventieve maatregelen worden toegepast, omdat het essentieel is dat de muizen artrose ontwikkelen. We passen wel humane eindpunten toe. Indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef genomen worden, dit komt echter zeer zelden voor. Om pijn tijdens behandelingen te voorkomen zal er volledige anesthesie worden toegepast bij bijvoorbeeld intra-articulaire injecties.

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.

De algemene humane eindpunten zullen worden toegepast. Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont, zal de muis uit de proef worden gehaald. Humane eindpunten zijn: ziekteverschijnselen en zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

Het verwachte level van ongerief is voor alle geïnccludeerde muizen matig.

End of experiment

L. Method of killing

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 weefsels te kunnen isoleren 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: 2017-0012
2. Titel van het project: Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?
3. Titel van de NTS: Kan de anti-ontstekingsstof Interleukine-37 (IL37) de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?
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: 12-04-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-05-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-05-2017 tot 15-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 15-05-2017
 - advies aan CCD: 01-06-2017
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: 08-05-2017
 - Datum antwoorden: 15-05-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

General information:

-2.1: De Commissie is van mening dat het niet alleen basic research betreft.

Antwoord: Met het projectvoorstel dat geschreven is, willen we inderdaad een klinische toepassing vinden voor IL37 om hiermee artrose patiënten te behandelen. Echter, het toedienen van IL37 middels een adenovirus heeft nog niet direct een klinische toepassing voor artrose patiënten, omdat tot op heden een adenovirus kan zorgen voor veel risico's en complicaties waardoor het nog niet veilig is voor de patiënt om deze methode te gebruiken. Mocht er uit deze dierstudie komen dat IL37 een potente therapie kan zijn voor artrose patiënten, dan gaan we zeker op zoek naar een vorm van therapie waarin we IL37 kunnen toepassen, bijvoorbeeld middels een "small molecule" die homologo is aan IL37 functie. Omdat er toch een klein

translationeel component in het projectvoorstel beschreven is, is er voor de zekerheid naast basic research ook translational and applied research aangekruist.

Project Proposal:

-3.1: Er worden twee diermodellen voor artrose gebruikt om het effect van IL37 op artrose te bestuderen. Waarom wordt IL37 toegepast in een model dat zich kenmerkt door minimale ontsteking, terwijl dit molecuul juist een ontstekingsremmend effect heeft? Uit de beschreven achtergrond van de projectaanvraag komt dit niet duidelijk naar voren (later wel maar de commissie adviseert dit al onder 3.1 uit te leggen).

Antwoord: IL37 is bekend geworden als een stof dat ontsteking kan onderdrukken in veel experimentele ziektemodellen die gepaard gaan met ontsteking. Echter, wij hebben met onze in vitro studies aangetoond dat IL37 in kraakbeen stukjes niet alleen een ontstekingsremmend effect heeft, maar dat het ook de functie van kraakbeenafbrekende enzymen kan remmen die aanwezig zijn bij artrose en via deze weg een direct effect heeft op kraakbeen. Hierdoor zou IL37 niet alleen beschermend werken tegen artrose dat gepaard gaat met grote ontsteking maar zou IL37 ook beschermend werken in een model waar minimale ontsteking aanwezig is maar wel de kraakbeenafbrekende enzymen aanwezig zijn. Als reactie hierop hebben we dit extra benadrukt onder 3.1 (zie blauw-gedrukte tekst).

-3.1: De commissie ziet net als de aanvragers ook een translationele component in dit onderzoek: 'Deze proeven zullen inzicht verschaffen in welk type artrose IL37 een belangrijke therapeutische rol kan spelen' (laatste zin onderdeel 3.1). Waarom hebben de aanvragers alleen basaal onderzoek aangekruist?

Antwoord: In het projectvoorstel is alleen basic research aangekruist, omdat een directe klinische toepassing voor IL37 met een adenovirus niet het meest waarschijnlijke is in artrose patiënten. Adenovirussen en daarmee ook gentherapie brengt veel risico's met zich mee en is daarom nog niet veilig om in patiënten te gebruiken. Echter, zoals ook in de reactie op commentaar 2.1 is beschreven, mocht er uit de dierstudies die beschreven zijn in dit projectvoorstel komen dat IL37 therapie zeer potent is, gaan we wel op zoek naar een vorm van therapie waarin we IL37 kunnen toepassen in artrose patiënten, bijvoorbeeld middels een "small molecule" die homoloog is aan IL37 functie. Omdat er toch een klein translationeel component in het projectvoorstel beschreven is, is er voor de zekerheid naast basic research ook translational and applied research aangekruist.

-3.1: Het translationele aspect van de studie (evaluatie van het therapeutische effect van inspuiten van het IL37-adenovirus in het aangedane kniegewricht) is nog niet goed beschreven in de inleiding. Is het bijvoorbeeld mogelijk om een adenovirus te gebruiken bij patiënten?

Antwoord: Wij hopen uit deze dierproeven te kunnen bepalen welk type artrose in patiënten behandeld zou kunnen worden met IL37. Het mooiste zou zijn om het IL37-adenovirus in te kunnen spuiten in het aangedane kniegewricht van artrose patiënten. Ondanks er meer successen komen uit onderzoeken met gentherapie, zijn er ook nog steeds gevaren van het gebruik van adenovirussen en is het nog niet veilig om adenovirussen in patiënten te gebruiken. Een andere optie voor het translationele aspect van deze studie, is om na bevestiging dat IL37 beschermend werkt tegen artrose een small-molecule te ontwikkelen dat homoloog is aan IL37. "Small molecules" kunnen effectieve weefsels penetreren en op de juiste plaats in het kniegewricht

terecht komen om de progressie van artrose te remmen. Een andere mogelijkheid zou zijn om een methode toe te passen die ervoor zorgt dat er langdurige afgifte is van het IL37 molecuul, zodat de beschermende effecten ook langdurig zouden werken. Als reactie hierop is het translationale aspect van deze studie verder uitgewerkt (zie dikgedrukte tekst).

-3.2: Recente literatuurverwijzingen in aanvulling op deze oude papers zouden de onderbouwing van de huidige haalbaarheid versterken.

Antwoord: De literatuurverwijzingen naar de bekendheid van ons lab op het gebied van artrose modellen zijn inderdaad aan de oude kant. Hiermee wilden we echter laten zien dat ons lab al een zeer lange tijd bekend is op het gebied van de experimentele artrose modellen. In aanvulling op deze oude papers zijn er meer recente papers aangehaald, om te laten zien dat we deze artrose modellen nog steeds regelmatig uitvoeren en goed in de vingers hebben om de haalbaarheid van dit project te versterken.

- *Van Dalen et al. Interleukin-1 is not involved in synovial inflammation and cartilage destruction in collagenase-induced osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2017; 25(3):385-396*
- *De Munter W et al. High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2016; 24(5):844-55*
- *Van den Bosch et al. Induction of Canonical Wnt Signaling by the Alarmins S100A8/A9 in murine knee joints: implications for osteoarthritis. Arthritis and Rheumatology 2016; 68(1):152-163*
- *Schelbergen RF et al. Prophylactic treatment with S100A9 inhibitor paquinimod reduces pathology in experimental collagenase-induced osteoarthritis. Annals Rheumatic disease 2015; 74(12):2254-8*
- *Blaney Davidson et al. Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage. Annals of Rheumatic Disease 2015; 74(6):1257-64*

Verder is er ook gekeken of andere laboratoria op het gebied van experimentele artrose bekend zijn met onze artrose-modellen. Ook hiervan zijn referenties toegevoegd:

- *Thysen S et al. Targets, models and challenges in osteoarthritis research (Review). Disease Models & mechanisms 2015 8:17-30*
- *Christiansen B et al. Non-invasive mouse models of post-traumatic osteoarthritis (Review). Osteoarthritis and Cartilage 2015 23:1627-1638*
- *Brandt et al. Animal models of osteoarthritis (Review). Biorheology 2002 221-235.*

-3.4.3: Gegeven de nadruk die in de inleiding op ontsteking wordt gelegd, is het voor de commissie niet duidelijk waarom beide modellen (die verschillen in de mate waarin ontsteking optreedt bij de artrose) geen voorspellende waarde voor elkaar hebben. Als er geen resultaten worden gevonden in het collagenasemodel (grote ontstekingscomponent), heeft het dan zin om de effecten in het andere model te testen? De onderzoekers worden verzocht dit go/no go moment op te nemen of duidelijker uit te leggen waarom beide modellen onafhankelijk van elkaar onderzocht zullen worden.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat er in de inleiding veel nadruk wordt gelegd op ontsteking. Het klopt ook dat er tot nu toe in de literatuur beschreven is dat IL37 de ontsteking remt in experimentele ontstekingsmodellen. Echter, ons lab heeft gevonden dat in kraakbeenstukjes IL37 niet alleen de ontsteking kan remmen maar ook de kraakbeenafbrekende enzymen (zoals MMPs en ADAMTS enzymen) en hierdoor een direct effect heeft op het kraakbeen zonder dat er ontsteking aanwezig is. Hierdoor kan het zijn dat in het collagenase-geïnduceerde artrose model waar veel ontsteking aanwezig IL37 beschermend kan werken door de ontsteking te remmen, maar het kan ook zijn dat IL37 beschermend werkt in het DMM-model (minimale ontsteking) door de kraakbeenafbrekende enzymen te remmen en daarmee de progressie van kraakbeenschade te remmen en niet zozeer de ontsteking. Doordat IL37 kan aangrijpen op twee verschillende aspecten van artrose (ontsteking en kraakbeenafbrekende enzymen) zullen het collagenase-model en DMM-model onafhankelijk van elkaar onderzocht worden. Als reactie op deze opmerking is er meer duidelijk gegeven in de tekst van deze projectaanvraag waarom het noodzakelijk is om beide artrose onafhankelijk van elkaar te onderzoeken.

Description of Animal Procedures:

**DAP1*

-B: De onderbouwing voor het gebruik van twee geslachten, waardoor er tweemaal zoveel muizen nodig zijn, ontbreekt. Is er een reden om te veronderstellen dat er een verschil in kinetiek zal zijn tussen mannen en vrouwen? Kan de kinetiek in één van de twee geslachten onderzocht worden en vervolgens bevestigd met een klein aantal dieren in het andere geslacht?

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat er in DAP1 beschreven is dat beide geslachten gebruikt zullen worden om de IL37 kinetiek te bepalen. Wij hebben echter geen sterke veronderstelling dat het verschil in kinetiek tussen mannen en vrouwen verschillend is. Artrose komt het meest voor in vrouwen, daarom hebben we besloten om DAP1 uit te voeren in alleen vrouwelijke muizen, waardoor er minder muizen nodig zijn voor deze DAP.

-B: Is het mogelijk om een globale fasering aan te brengen in deze experimenten, bijvoorbeeld eerst de expressie van IL37 te controleren op een vroeg tijdstip voordat er uitgebreide histologie zal plaatsvinden?

Antwoord: Het is een goed idee van de commissie om globale fasering aan te brengen, hiervoor zullen we DAP1 opsplitsen in twee delen. Eerst zullen we via RNA samples en wash-outs bepalen of het IL37-adenovirus op gen en eiwit niveau tot expressie wordt gebracht. Mocht het adenovirus goed tot expressie komen op RNA en eiwitniveau, dan zullen we vervolgens via histologie gaan kijken of het adenovirus zelf geen schade aanbrengt aan het gewricht. Mochten we er achter komen dat het IL37-adenovirus niet tot expressie komt op gen of eiwitniveau, dan hebben we een no-go moment en hoeven we ook geen experiment in te zetten voor histologie.

-D2: Het tweede deel van de vraag is niet beantwoord.

Antwoord: Deze opmerking betreft de vraag "measures to minimise adverse effects". Deze vraag hadden we in de DAP als volgt beantwoord:

"De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De operatie en injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam

biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast." Deze vraag hebben we nu uitgebreid met de volgende reactie:

Deze DAP is bedoeld om de kinetiek en basale effecten van het IL37-adenovirus te bestuderen in de muis. We gebruiken hiervoor naïeve muizen, dus we passen geen artrose model toe. Verder zullen de muizen hiervoor eenmalig een adenovirus injectie toegediend krijgen en is het een kortlopend experiment. Omdat we niet verwachten dat het IL37-adenovirus ongerief zal aanbrengen aan de muis, passen we geen maatregelen toe om negatieve effecten te minimaliseren.

De volgende tekst is toegevoegd aan alle DAPs: "In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn."

-K: Is het ongerief juist ingeschat? Op grond waarvan is het ongerief van deze kortdurende procedure onder anesthesie ingeschat als matig ongerief? Er worden geen nadelige effecten van IL37 expressie verwacht en de looptijd van het experiment voor veel dieren is een week of minder.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat de mate van ongerief te hoog is ingeschat, aangezien het een kortlopend experiment is en er geen nadelige effecten van IL37 worden verwacht. Daarom is de mate van ongerief veranderd in licht ongerief.

*DAP2

-A: Is er een reden om geen go/no go moment op te nemen tussen beide studies? (geldt ook voor DAP3)

Antwoord: Deze opmerking betreft het feit dat we in het beschreven DMM-model twee experimenten zullen uitvoeren:

1) injectie van het IL37-adenovirus vroeg aan het begin van het DMM-model;

2) injectie van het IL37-adenovirus laat in het DMM-model wanneer er al schade aanwezig is.

Deze twee experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin we het IL37-adenovirus vroeg in het model zullen injecteren, bestuderen we of artrose patiënten waarbij kort geleden artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben. Hierbij gaat het vooral om het bestuderen of IL37 de initiatie van kraakbeenschade kan remmen. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we of artrose patiënten die al langere tijd artrose hebben en dus waarschijnlijk ernstigere kraakbeenschade aanwezig is, IL37 nog als therapie toegepast kan worden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen. In deze twee fasen vinden verschillende processen plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we in deze DAP geen go/no go moment invoegen.

-B: Waarom loopt het experiment beter in mannen en wat wordt in dit geval bedoeld met "beter lopen"? Zijn er om die reden minder dieren nodig om een statistisch significant resultaat te behalen? De onderzoekers vermelden dat het artroseproces in mannen anders verloopt dan in vrouwen. Gelden de conclusies die uit deze experimenten met alleen mannelijke dieren komen dan ook alleen voor mannen?

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat er onduidelijk verwoord is, wat er bedoeld wordt met 'het experiment loopt beter in mannen'. Allereerst is de OA pathologie tussen mannetjes en vrouwtjes muizen hetzelfde, hierdoor gelden de conclusies die getrokken worden uit de experimenten uitgevoerd in het mannelijk geslacht ook voor het vrouwelijk geslacht. Wel is het beschreven dat geslachtshormonen in muizen de progressie van het artroseproces kunnen beïnvloeden (1). Zo zouden vrouwelijke hormonen de ernst van artrose kunnen verlagen, terwijl mannelijke hormonen kunnen leiden tot ernstigere artrose. In het DMM-model zijn vrouwelijke muizen hierdoor minder gevoelig voor de inductie van artrose. Voor mannelijke muizen is dit geen probleem en zal er artrose ontwikkeling plaatsvinden wanneer het DMM-model zal worden toegepast. Omdat we uit ervaring en vanuit de literatuur weten dat het DMM-model zeker artrose zal induceren in mannelijke muizen zal er minder variatie optreden wanneer we het DMM-model uitvoeren in het mannelijke geslacht en weten we zeker dat we het effect van IL37 op artrose kunnen bestuderen, terwijl dit bij vrouwelijke muizen niet zeker is. Omdat het DMM-model binnen het mannelijke geslacht zeker tot artrose zal leiden en er minder variatie plaatsvindt ten opzichte van het vrouwelijke geslacht, zullen er minder dieren nodig zijn om een statistisch significant resultaat te behalen. Wanneer we muizen met het vrouwelijke geslacht zouden willen gebruiken, zouden we grote groepen muizen nodig hebben wat we ethisch niet verantwoord vinden. Aangezien de pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, hebben we er daarvoor voor gekozen om muizen met het mannelijke geslacht te gebruiken. Onderstaande referentie is ingevoegd in de DAP.

(1) Ma HL et al. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical Mouse model. Osteoarthritis and Cartilage 2007. 15(6):695-700

-H: De genoemde medicatie is geen pijnbestrijding.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat de genoemde medicatie (dexdomitor + ketamine) geen pijnbestrijdingsmiddelen zijn. Als reactie op deze opmerking zijn daarom de namen van de narcose middelen uit de tekst verwijderd.

*DAP3

-A: Is er een reden om geen go/no go moment op te nemen tussen beide studies? (geldt ook voor DAP3).

Antwoord: Deze opmerking betreft het feit dat we in het beschreven collagenase-geïnduceerde artrose model twee experimenten zullen uitvoeren:

1) injectie van het IL37-adenovirus vroeg aan het begin van het collagenase-geïnduceerde artrose;

2) injectie van het IL37-adenovirus laat in het collagenase-geïnduceerde artrose wanneer er al schade aanwezig is.

Deze twee experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin we het IL37-adenovirus vroeg in het model zullen injecteren, bestuderen we of artrose patiënten waarbij kort geleden artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben. Hierbij gaat het vooral om het bestuderen of IL37 de initiatie van kraakbeenschade kan remmen. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we of artrose patiënten die al langere tijd artrose hebben en dus waarschijnlijk ernstigere kraakbeenschade aanwezig is, IL37 nog als therapie toegepast kan worden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan brengen. In deze twee fasen vinden verschillende processen

plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we in deze DAP geen go/no go moment invoegen.

-B: De aanvrager wil de experimenten met vrouwelijke dieren uitvoeren omdat de mannelijke dieren in dit model vaak vechten. Als redenen hiervoor worden de lange duur en randomisatie genoemd. De muizen worden op relatief oude leeftijd besteld bij de leverancier. Is al geprobeerd om dieren van jongere leeftijd te bestellen, waardoor zij gerandomiseerd kunnen worden zonder dat dit leidt tot vechten?

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat de muizen op een relatief oude leeftijd besteld worden. Binnen ons lab zijn er al veel manieren geprobeerd om het probleem met vechtende mannetjes te voorkomen, waaronder de mannetjes muizen al op een jongere leeftijd te bestellen en vervolgens te randomiseren. Echter, hieruit is gebleken dat het probleem van de vechtende mannetjes blijft bestaan waardoor we niet het risico willen lopen dat we in de experimenten beschreven in de projectvoorstel te maken krijgen met hoge uitval door vechtende muizen en onze groepen te klein worden om nog een significant resultaat te kunnen behalen.

-B: De onderzoekers vermelden dat het artroseproces in mannen anders verloopt dan in vrouwen. Gelden de conclusies die uit deze experimenten met alleen vrouwelijke dieren komen dan ook alleen voor vrouwen?

Antwoord: Zoals eerder beschreven is in DAP 2 is de OA pathologie tussen het mannelijk en vrouwelijk geslacht hetzelfde. Hierdoor gelden de conclusies die we verkrijgen uit de experimenten met het vrouwelijke geslacht ook voor het mannelijke geslacht. Echter door het vechten van de mannelijke muizen kan het artroseproces versterkt worden en leiden tot een grote hoeveelheid dislocaties van het kniegewricht van de muis en dus uitval van een groot aantal muizen binnen het experiment, waardoor de kans bestaat dat de grootte van onze muizengroepen te klein wordt om een statistisch significant resultaat te behalen. Hierdoor zouden we grote groepen mannetjes muizen nodig hebben om een significant resultaat te kunnen bepalen, wat we ethisch niet verantwoord vinden. Omdat de OA pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, hebben we daarom gekozen om het collagenase-geïnduceerde artrose model in vrouwelijke muizen uit te voeren.

-I: Het ongerief van injecties is doorgaans niet matig maar licht.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat het ongerief van de injecties licht is. Echter, wordt het ongerief wat het collagenase-geïnduceerde artrose model met zich meebrengt gezien als matig ongerief. Daarom hebben we de mate van ongerief op matig laten staan.

Niet-technische samenvatting:

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

Antwoord: De Niet Technische Samenvatting is aangepast naar aanleiding van de bovenstaande opmerkingen.

-3.3: Men verwacht dat er minder dieren nodig zijn dan het maximaal te gebruiken aantal. Dit voorbehoud blijkt niet uit het project.

Antwoord: Naar aanleiding van de veranderingen toegepast in de DAPs, is het aantal dieren dat nodig is voor de beschreven experimentele artrose modellen aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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 en 4b 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 doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is bepalen of IL37 het artroseproces in muismodellen kan remmen of voorkomen. Het uiteindelijke doel is een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van effectieve therapieën voor artrose. Het effect van IL37 wordt onderzocht in twee modellen waarin hetzij veel hetzij weinig gewrichtsontsteking optreedt. Op die manier wordt duidelijk bij welke patiënten een behandeling met IL37 een positief effect zou kunnen hebben. Er is binnen dit project daarom een directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De DEC acht het waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van het effect van IL37 op een artrotisch gewricht op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden voor artrose en dat daar behoefte aan is. 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 is dit onderzoek indirect van belang, omdat het op de lange termijn 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 weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor invaliderende ziekten, zoals artrose, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

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: "Tijdens de ontwikkeling van artrose zal er geen pijnbestrijding plaats vinden, omdat dit effect kan hebben op het verloop van het artrose proces." 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 bepaald door de operatie van het kniegewricht en door de voortschrijdende artrose. De DEC schat het ongerief voor de dieren in bijlage 1 in als licht (15% van de dieren). Voor de overige dieren zal het ongerief matig zijn.
12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door het induceren van artrose in één van beide knieën, en het instrumentele gebruik dat inherent is aan dierproeven.
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 ervaring 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. Artrose is een complex degeneratief proces waarbij meerdere celtypen en het immuunsysteem zijn betrokken. Bovendien speelt mechanische belasting ook een rol. Effecten op artrose kunnen daarom niet goed zonder proefdiermodellen worden onderzocht. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet 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 en het toepassen van go/ no go beslissingen wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Er wordt adequate pijnstilling toegepast waar dit nodig en mogelijk is. Van de meeste pijnstillers is bekend dat zij een effect hebben op ontstekingsprocessen in muizen, en van de overige pijnstillers is niet aangetoond dat zij geen effect hebben op ontstekingsprocessen in muizen. Ontsteking is een belangrijke parameter in dit onderzoek. Daarom is het niet mogelijk om de pijn die ontstaat door de zich ontwikkelende artrose te verlichten. 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.

18. De aanvrager zal in het project in bijlage 1 en 3 alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. In bijlage 2 zullen alleen mannelijke dieren gebruikt worden. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing:
- *bijlage 1: We kiezen ervoor om het expressiepatroon van het IL37-adenovirus te bestuderen in vrouwtjes muizen, omdat we geen sterke veronderstelling hebben dat er verschil aanwezig is tussen het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in mannetjes en vrouwtjes muizen. Daarnaast komt artrose het meest voor in vrouwtjes muizen.
 - *bijlage 2: De OA pathologie tussen mannetjes en vrouwtjes muizen is hetzelfde, hierdoor gelden de conclusies die getrokken worden uit de experimenten uitgevoerd in het mannelijk geslacht ook voor het vrouwelijk geslacht. Het is beschreven dat geslachtshormonen in muizen de progressie van het artroseproces kunnen beïnvloeden. Zo zouden vrouwelijke hormonen de ernst van artrose kunnen verlagen, terwijl mannelijke hormonen kunnen leiden tot ernstigere artrose. In het DMM-model zijn vrouwelijke muizen hierdoor minder gevoelig voor de inductie van artrose. Voor mannelijke muizen is dit geen probleem en zal er artrose ontwikkeling plaatsvinden wanneer het DMM-model zal worden toegepast met minder variatie binnen de groepen. Wanneer we het DMM-model uitvoeren in vrouwelijke muizen zal er veel variatie plaats vinden en zouden we grote groepen muizen nodig hebben om een significant resultaat te kunnen behalen, wat we ethisch niet verantwoord vinden. Aangezien de pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, is er gekozen om muizen met het mannelijke geslacht te gebruiken.
 - *bijlage 3: De OA pathologie tussen het mannelijk en vrouwelijk geslacht zijn hetzelfde. Hierdoor gelden conclusies die we verkrijgen uit de experimenten met het vrouwelijke geslacht ook voor het mannelijke geslacht. Echter door het vechten van de mannelijke muizen kan het artroseproces versterkt worden en leiden tot een grote hoeveelheid dislocaties van het kniegewricht van de muis en dus uitval van een groot aantal muizen binnen het experiment. Hierdoor bestaat de kans dat de grootte van onze muizengroepen te klein wordt om een statistisch significant resultaat te behalen. Er zouden dan grote groepen mannetjes muizen nodig zijn om een significant resultaat te kunnen bepalen, wat we ethisch niet verantwoord vinden. Omdat de OA pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, hebben we daarom gekozen om het CiOA-model uit te voeren in vrouwelijke muizen.
- 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 in twee bijlagen met alleen vrouwelijke en in één bijlage 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 lichte of 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 is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Artrose komt vaak voor in de bevolking, en de prevalentie zal waarschijnlijk toenemen door de vergrijzing. Deze aandoening belemmert patiënten sterk in hun dagelijkse bezigheden en vermindert hun kwaliteit van leven in ernstige mate. De enige effectieve behandeling op dit moment is een vervanging van het aangedane gewricht via een operatie, maar dit is niet zonder risico's voor de patiënt en is niet voor alle gewrichten mogelijk. Er is daarom behoefte aan behandelingen die het voortschrijdende artroseproces kunnen stoppen, en beschadigd kraakbeen kunnen herstellen. De resultaten van dit project zullen bijdragen aan de ontwikkeling van dergelijke therapieën voor artrose. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van een nieuwe therapieën voor artrose van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: bepalen of IL37 het artroseproces in muismodellen kan remmen of voorkomen. Het uiteindelijke doel is een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van effectieve therapieën voor artrose. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten 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 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
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
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
AVD1030020171984
Bijlagen
2

Datum 1 juni 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 juni 2017. Het gaat om uw project "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171984. 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:

1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171984

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 29
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie: Instantievoor Dierenwelzijn

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag

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

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2017

Geplande einddatum: 30 juni 2022

Titel project: Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?

Titel niet-technische samenvatting: Kan de anti-ontstekingsstof Interleukine-37 (IL37) de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?

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: [REDACTED]

Functie: Instantie voor dierenwelzijn

Plaats: Nijmegen

Datum: 1 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor dierenwelzijn

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
AVD1030020171984

Bijlagen

2

Datum 1 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 juni 2017

Vervaldatum: 1 juli 2017

Factuurnummer: 171984

Ordernummer: 040823-461220/ 2017-0012 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171984	€ 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: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 23 juni 2017 11:58
Aan: Postbus instantie voor dierenwelzijn
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD1030020171984: Aanhouden beoordelen

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn,

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen? met aanvraagnummer AVD1030020171984. 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 alleen vrouwelijke dieren te gebruiken in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.3 en alleen mannelijke dieren in bijlage 3.4.4.2. U geeft voor bijlage 3.4.4.1 aan geen sterke veronderstelling te hebben dat er een verschil is tussen het expressiepatroon van het IL-37 adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. De reden om toch alleen vrouwelijke dieren te gebruiken is dat artrose meer voor komt in vrouwen.

Dit lijkt niet voldoende grond om deze proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren, met name omdat de proeven in bijlage 3.4.4.2 juist met mannelijke dieren worden uitgevoerd. Het is daarnaast niet geheel duidelijk waarom in bijlage 3.4.4.2 voor mannelijke dieren gekozen wordt, terwijl in bijlage 3.4.4.3 het onderzoek juist met vrouwelijke dieren wordt uitgevoerd. De argumentatie om in bijlage 3.4.4.2 mannelijke dieren te gebruiken lijken ook te gelden voor bijlage 3.4.4.3 en vice versa. U wordt verzocht uw keuzes voor het gebruik van of alleen mannelijke of alleen vrouwelijke dieren beter te onderbouwen.

-Het ongerief in de NTS komt niet overeen met het ongerief in de aanvraag. U wordt verzocht de NTS in overeenstemming te brengen met de aanvraag.

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
.....

Beste Commissie Centrale Dierproeven,

Op 1 juni 2017 heeft u een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen, getiteld "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" (aanvraagnummer AVD1030020171984). Naar aanleiding van deze aanvraag waren er nog enkele onduidelijkheden, die ik graag verder wil uitleggen.

Onduidelijkheid 1

U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te gebruiken in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 en alleen mannelijke dieren in bijlage 2.4.4. U geeft voor bijlage 3.4.4.1 aan geen sterke veronderstelling te hebben dat er een verschil is tussen het expressiepatroon van het IL-37 adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. De reden om toch alleen vrouwelijke dieren te gebruiken is dat artrose meer voorkomt in vrouwen. Dit lijkt niet voldoende grond om deze proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren, met name omdat de proeven in bijlage 3.4.4.2 juist met mannelijke dieren worden uitgevoerd.

Reactie

In bijlage 3.4.4.1 van de projectaanvraag is inderdaad beschreven om het expressiepatroon van het IL-37 adenovirus alleen te onderzoeken in vrouwelijke dieren. Deze keuze voor het gebruik van vrouwelijke vrouwen is zowel gebaseerd op het feit dat artrose meer voorkomt in vrouwen als dat mannelijke dieren eerder de neiging hebben om te gaan vechten. Dit zou kunnen leiden tot hoge uitval van dieren binnen onze groepen, waardoor het moeilijk kan worden om betrouwbare conclusies uit deze experimenten te halen. Aangezien bijlage 3.4.4.1 een validatie is van de methode die we willen gebruiken in de experimentele artrosemodellen, willen we zeker weten dat we goede en duidelijke conclusies konden trekken uit de experimenten van bijlage 3.4.4.1 voordat we de experimentele artrose modellen uitvoeren. Omdat we geen reden hebben dat het expressiepatroon van het IL37-adenovirus verschillend zou zijn tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, wilden we niet onnodig veel dieren gebruiken en hebben we gekozen voor vrouwelijke dieren. Echter, weten we niet geheel zeker of het expressiepatroon van het adenovirus hetzelfde zal zijn in beide geslachten. Zoals u al opmerkt worden in bijlage 3.4.4.2 gebruik gemaakt van mannelijke dieren en in bijlage 3.4.4.3 wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren. De validatie experimenten in bijlage 1 zijn van groot belang voor de vervolgentoetsen in bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3. Ondanks het feit dat we twee keer zoveel dieren nodig hebben, hebben we toch besloten om, naast het uitvoeren van de experimenten ter validatie van het IL37-adenovirus expressiepatroon in vrouwelijke dieren, ook dezelfde experimenten zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1 uit te voeren in mannelijke dieren. Op deze manier kunnen we met zekerheid het juiste IL37 expressiepatroon bepalen tijdens de experimentele artrosemodellen voor zowel bijlage 3.4.4.2 als 3.4.4.3 en eventueel uitsluiten dat er verschillen zijn tussen het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. Mochten er inderdaad verschillen aanwezig zijn in het expressiepatroon van het IL37-adenovirus tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, kunnen we onze experimenten in bijlage 3.4.4.3 optimaliseren met onze resultaten verkregen uit de experimenten van bijlage 3.4.4.1 met de mannelijke dieren.

Onduidelijkheid 2

Het is daarnaast niet geheel duidelijk waarom in bijlage 3.4.4.2 voor mannelijke dieren gekozen wordt, terwijl in bijlage 3.4.4.3 het onderzoek juist met vrouwelijke dieren wordt uitgevoerd. De argumentatie om in bijlage 3.4.4.2 mannelijke dieren te gebruiken lijken ook te gelden voor bijlage 3.4.4.3 en vice versa. U wordt verzocht uw keuzes voor het gebruik van of alleen mannelijke of vrouwelijke dieren beter te onderbouwen.

Reactie

In de projectaanvraag is inderdaad beschreven om voor bijlage 3.4.4.2 alleen mannelijke dieren te gebruiken en in bijlage 3.4.4.3 alleen vrouwelijke dieren.

In bijlage 3.4.4.2 gaat het om het experimentele DMM-model (surgical model for destabilization of medial meniscus-model). Argumentatie om dit model uit te voeren in mannelijke muizen komt voort uit de literatuur. In de literatuur is in 2007 het volgende artikel verschenen van Glasson SS *et al.*: "Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model" (Osteoarthritis and Cartilage, 2007). In deze studie wordt laten zien dat mannelijke muizen significant 'more severe' artrose ontwikkelen dan vrouwelijke muizen op alle tijdstippen van het zogeheten DMM-model. Mannelijke muizen laten extensieve fibrillatie zien, tidemark erosie en verlies van proteoglycanen, terwijl de effecten van dit model in vrouwelijke muizen zich beperken tot oppervlakkige fibrillatie en lokaal proteoglycaan verlies. De vrouwelijke muizen van verschillende strains laten sterke bescherming zien tegen dit artrosemodel, waardoor artrose zich niet of met mate ontwikkelt. Hierdoor is het moeilijk om het effect van IL37, waarvan we verwachten dat het een beschermend effect heeft op artrose, te onderzoeken op het moment dat er bijna geen artrose plaatsvindt. De keuze voor het DMM-model in mannelijke muizen wordt verder ondersteund vanuit de literatuur. Recent gepubliceerde studies waarin het DMM-model is toegepast door verschillende onafhankelijke onderzoeksgroepen, zijn allemaal uitgevoerd in mannelijke muizen. Voorbeelden van deze publicaties zijn:

- 1) Rachel E. Miller, Shingo Ishihara *et al.* Chemogenetic inhibition of pain neurons in a mouse model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017
- 2) Oscar Alvarez-Garcia, Tokio Matsuzaki *et al.* Regulated in development and DNA Damage Response 1 Deficiency impairs autophagy and mitochondrial biogenesis in articular cartilage and increases the severity of experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017.
- 3) P. Das Neves Borges, T. Vincent *et al.* Automated assessment of bone changes in cross-sectional micro-CT studies of murine experimental osteoarthritis. *PLoS One*, 2017.
- 4) Averi Gibson, Carrie Mingalone *et al.* Wnt7a inhibits IL-1 β induced catabolic gene expression and prevents articular cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Scientific Reports*, 2017.

- 5) F Veronesi, G Giavaresi *et al.* Chondroprotective activity of N-acetyl phenylalanine glucosamine derivative on knee joint structure and inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
- 6) Miotla Zarebska, Chanalaris A *et al.* CCL2 and CCR2 regulate pain-related behavior and early gene expression in post-traumatic murine osteoarthritis but contribute little to chondropathy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
- 7) A Latourte A, C Cherifi *et al.* Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
- 8) W Choi and J Chun. Upregulation of lipocalin-2 (LCN2) in osteoarthritic cartilage is not necessary for cartilage destruction in mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
- 9) Neng-Yu Lin, Alfiya Distler *et al.* Inhibition of Notch1 promotes hedgehog signaling in a HES1-dependent manner in chondrocytes and exacerbates experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
- 10) NH Lim, TL Vincent *et al.* In vivo optical imaging of early osteoarthritis using an antibody specific to damaged arthritis cartilage. *Arthritis Research and Therapy*, 2015.

Gebaseerd op de studie uit 2007 van Glasson *et al.* die aantoonde dat de DMM-artrose maar matig ontwikkelt in vrouwelijke muizen en de recente publicaties die zijn verschenen waarin het DMM-model alleen uitgevoerd is in mannelijke muizen, hebben we besloten om onze experimenten beschreven in bijlage 3.4.4.2 alleen uit te voeren in mannelijke muizen. Hierdoor voorkomen we dat we onnodig veel muizen hoeven te gebruiken, die wetenschappelijk gezien geen extra inzicht zouden geven in het effect van IL37 op de experimentele artrose geïnduceerd door het DMM-model, door het ontbreken van een therapeutisch window. Wel weten we dat mannelijke muizen eerder de neiging hebben om te vechten dan vrouwelijke muizen. Hiermee is rekening gehouden in de berekening van de grootte van de experimentele groepen. Verder worden er maatregelen getroffen om de kans op vechten te minimaliseren, zoals voorkomen dat de muizen herverdeeld worden en er wordt gebruik gemaakt van lavendelspray. We hopen hiermee zo optimaal mogelijk te voldoen aan vermindering en verfijning.

In bijlage 3.4.4.3 gaat het om het experimentele artrosemodel collageenase-induced osteoarthritis (CiOA-model). Dit model zouden we graag alleen toepassen in vrouwelijke muizen. Het collageenase-induced OA-model kan zowel in mannelijke als in vrouwelijke muizen worden toegepast. Echter, uit eigen ervaring van onze diermodellen en gebaseerd op de literatuur is bekend dat mannelijke muizen vaker vechten. In 2013 is een publicatie verschenen van Meakin Lee *et al.*, genaamd: "Male mice housed in groups engage in frequent fighting and show a lower response to additional bone loading than females or individually housed males that do not fight" (Bone, 2013). In deze publicatie hebben ze de observatie gedaan dat mannelijke muizen betrokken zijn bij gevechten 1.3 keer per uur, terwijl vrouwelijke muizen niet vechten. Het vechten van de mannelijke muizen heeft hun onderzoeksresultaten beïnvloedt. Wat wij ervaren hebben uit onze dierexperimenten, is dat het vechten van mannelijke muizen resulteert in veel dislocaties van het kniegewricht. Wanneer er dislocaties optreden, is het niet verantwoord om de muizen in het experiment te laten, waardoor we de muizen vanwege ethische redenen uit het experiment halen. Verder is het beleid dat wanneer de muizen vechten, de vechter apart moet worden gezet wat weer invloed heeft op de ontwikkeling van artrose. Wanneer we mannelijke muizen zouden gebruiken zouden we veel muizen vroegtijdig uit onze experimenten moeten halen vanwege de dislocaties, waardoor we vanaf het begin grote experimentele groepen van muizen nodig hebben om nog betrouwbare conclusies te kunnen trekken uit onze resultaten. Vanwege het hoge aantal mannelijke muizen dat we voor dit model nodig zouden hebben en het ongerief dat dit met zich meebrengt, hebben we gekozen voor optimale verfijning van het experiment en besloten om bijlage 3.4.4.3 alleen in vrouwelijke muizen uit te voeren.

Onduidelijkheid 3

Het ongerief in de NTS komt niet overeen met het ongerief in de aanvraag. U wordt verzocht de NTS in overeenstemming te brengen met de aanvraag.

Reactie

Het klopt dat het ongerief in de NTS niet overeenkomt met het ongerief in de aanvraag. De NTS is in overeenstemming gebracht met de aanvraag.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



04 JUL 2017

Datum 3 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

**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
AVD1030020171984
Bijlagen
1

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" met aanvraagnummer AVD1030020171984. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is de keuze voor het gebruik van mannelijke dan wel vrouwelijke dieren in de verschillende bijlagen verhelderd, en is de ongeriefsclassificatie in de NTS en de aanvraag met elkaar in overeenstemming gebracht.

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 "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 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 1 juni 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:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



M. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984



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 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" met aanvraagnummer AVD1030020171984, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Validatie van het IL37-adenovirus in muizen				
	Muizen (Mus musculus) /	312	100% Licht	
3.4.4.2. Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model				
	Muizen (Mus musculus) /	882	100% Matig	
3.4.4.3. Effect van IL37 op gewrichtsschade in het CiOA-model				
	Muizen (Mus musculus) /	882	100% Matig	

Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

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:

AVD1030020171984

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:

AVD1030020171984

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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.