

		Inventaris Wob-verzoek W17-12								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20172465	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel				x		x	x	
4		Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5		Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6		Referentielijst			x					
7		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8		Dec-advies				x			x	
9		Adviesnota CCD		x						x
10		Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.
- ☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie UMC Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]
KvK-nummer 30244197
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.
- Straat en huisnummer Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
Postcode en plaats 3501AA Utrecht
IBAN NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer Universiteit Utrecht
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [Redacted] ☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie [Redacted]
Afdeling [Redacted]
Telefoonnummer [Redacted]
E-mailadres [Redacted]
- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [Redacted] ☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie [Redacted]
Afdeling [Redacted]
Telefoonnummer [Redacted]
E-mailadres [Redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters ☐ Dhr. ☐ Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- ☐ Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 9 - 2017
- Einddatum 1 - 9 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Strategieën voor botregeneratie vanuit kraakbeen in mond- kaak en aangezichtschirurgische ingrepen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287 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
- ☐

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



Utzeght





Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

3.1.1 Motivation and background

Bone is the second most commonly transplanted tissue(1), as bone grafting is required in several orthopaedic, neurosurgical and dental procedures such as craniomaxillofacial reconstructions, spinal fusion techniques or

delayed fusion of bone defects (delayed unions and non-unions) (2, 3). Autografts, which represent the current golden standard, have an excellent success rate and a complete immunocompatibility. However, due to several drawbacks, including donor-site morbidity, limited tissue availability and surgical complications, this procedure is suboptimal or not always an option (4). Allografts are considered the surgeon's second best option. However, the percentage of successful graft incorporation is lower and the procedure is not completely free from the risk of immune rejection and pathogen transmission (4, 5). To overcome these limitations, a bone substitute is required, preferably as an off-the-shelf product. Currently, next to tissue transplantation, several non-regenerative treatment options are available such as polymer or titanium prostheses that do not adapt or grow. These prosthetic solutions have a limited lifespan in the patient, most commonly due to infections. As mentioned, substitutes could be engineered via regenerative medicine strategies. These can be based on the use of (stem) cells and/or biomaterials. The latter is less complex and has found its way into the clinic. Various calcium phosphate-based materials (representing the inorganic component of bone tissue) are applied in the clinic when no tissue can be transplanted. However, the clinical outcomes with these materials are inferior to the gold standard transplantation treatment options. This warrants the exploration of creating bone substitutes based on both cells and materials. A relatively new and promising approach herein is to initiate and stimulate endochondral bone regeneration.

Endochondral bone is formed from a cartilaginous template that mineralizes and, following vascular invasion, is converted into bone tissue (6). This type of bone formation is typically seen in growth plates or in fracture healing. The endochondral process can be mimicked by stimulating chondrogenesis (cartilage formation) in bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) (7).

■ shown that following implantation of cartilaginous tissue from MSCs, conversion into bone tissue can take place. The present project will aim to take steps towards the clinical translation of this approach.

3.1.2 State of the art

The successful concept of the endochondral approach to bone regeneration has been demonstrated at subcutaneous locations (8-12). Here, MSC cultures in aggregate form or within biomaterial carriers, pre-cultured in chondrogenic medium for 2-7 weeks, could repeatedly induce endochondral bone formation (10-14). Although the feasibility and reproducibility of the approach itself has been established, crucial translational questions remain unaddressed. Therefore, these questions will form the focus of this project and are detailed under 3.2.

■ is at the forefront of the field in endochondral bone regeneration. This research line was initiated with the ■. In that project the feasibility of endochondral bone regeneration was demonstrated for human cells in an immuno-incompetent rat model (subcutaneous and femur defect) (13, 15). Last year, we received a grant from ■ to conduct studies focusing on the translational potential of endochondral bone regeneration.

3.1.3 Research lines

■, bone regenerative research lines are inspired by the two natural processes of bone formation in humans: these are the (vascularized) intramembranous and the endochondral routes that contribute to developmental bone formation and to bone healing (16). The flowchart depicted below illustrates our research line organization. It further highlights the translational approach from the more fundamental *in vitro* evaluations to large animal models. The present project proposal will focus on the part shown in the flowchart within the endochondral research line (outlined by red box) with experiments that will be performed in small animal models following 'go/no go' evaluation (*i.e.* confirmation of chondrogenic potential) in ■ established *in vitro* models.

Endochondral route in the flowchart

Our *in vitro* culture models encompass *e.g.* cell aggregation into spherical cartilage tissues (pellets) and encapsulation of single cells and/or pellets in biomaterials such as hydrogels. Once chondrogenic and hypertrophic potential of the cells is confirmed in pellets or in the materials, conversion of this tissue into bone can be assessed in small animal models. The subcutaneous model can demonstrate that the construct can indeed be converted into bone tissue and the model is suitable for screening purposes. The bone forming potential in an orthotopic location (femur) can also be established in the rat.

The next steps after this project would involve preclinical testing

Following this validation, an evaluation in the clinical practice (veterinary and/or human, not shown in flowchart) will ensue.

3.2 Purpose

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

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

The main aim of this proposal is to translate endochondral bone regeneration (EBR) towards a clinically relevant application.

The main aim will be addressed by studying all relevant translational aspects of the project in our sub-aims:

1) studying the effects of using cells for EBR.

- Will chondrogenically differentiated cells be capable of initiating EBR?
- Does the level of between cells and the influence EBR?
- Will chondrogenically differentiated cells affect EBR
- Which are recruited or activated upon implantation of (chondrogenically differentiated) cells?

2) exploring the potential of devitalized cell-based constructs to induce EBR.

- Do devitalized cartilage constructs or cartilage-derived matrices have sufficient bioactivity to induce EBR?
- Does timing of devitalization affect the construct's ability to induce endochondral bone regeneration?

- Do decellularized or devitalized constructs activate [REDACTED]

3) establishing a relevant preclinical model for EBR.

- Does the implant [REDACTED] influence the EBR process in immunocompetent animals?
- Can we create a model for EBR that allows an increase in the number of implants per animal?

4) evaluating the feasibility of EBR when increasing construct size.

- Which methods for increasing construct size result in most homogeneous tissue formation?
- Can we design an implant that induces EBR also [REDACTED]

5) characterizing the EBR potential of various cell and/or material combinations.

- Is there an optimal combination of cells and/or materials for EBR?
- Can we use other cells than MSCs for EBR? Or MSCs from different aspiration locations?
- Which materials can stimulate EBR progression?
- When using components approved for clinical use, will EBR still be effective?
- Does donor variation affect EBR? Can we [REDACTED] in EBR?

The aims are achievable in 5 years:

- The main aim is achievable by addressing our sub-aims that will provide more insight in the boundary conditions under which endochondral bone regeneration is feasible. Specifically, in five years from now we 1) will know if EBR is possible [REDACTED], 2) can indicate when to devitalize a construct for EBR and if current methods eliminate construct bioactivity, 3) will have established if an [REDACTED] implant [REDACTED] will affect EBR, 4) will have more insight in how to approach the scale-up of the size of engineered constructs for efficient conversion into bone tissue, and 5) have characterized the potential of various cell and/or material combinations for EBR. Together, these achievements will bring EBR to a level where preclinical testing of favorable constructs in large animal models is possible.

- In addition to the establishment of *in vitro* models and *in vivo* models as listed under 3.1.2, [REDACTED] animal models for bone regeneration (13, 15, 17). [REDACTED] cartilage and bone regenerative strategies, both *in vitro* and *in vivo*, [REDACTED] (13, 15, 17-21). Since [REDACTED]

[REDACTED] o far, [REDACTED] s and [REDACTED] current h-index is 20.

- The [REDACTED] longstanding expertise in bone regeneration research and all equipment and infrastructure required for this project are already available (the [REDACTED] in the [REDACTED], where regenerative facilities and expertise are clustered). Further, the [REDACTED] surgeons are dedicated to contribute to research where applicable and will be involved in the surgical aspects of studies.

- [REDACTED] with other regenerative groups are essential to this project, especially the dept [REDACTED]. Further, [REDACTED] foreign labs, includin [REDACTED]

[REDACTED] will work on the project, ensuring sufficient manpower to perform the required studies. Continuous application for research funding results in regular grants enabling sustenance of our research and manpower. In total, [REDACTED] has secured over [REDACTED] funding, of which [REDACTED] in 2016. Part of the proposed studies [REDACTED] and as such accepted by international reviewers as feasible and realistic studies that can be performed within the project's time frame within the next five years.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

Our strategy is to combine basic and translational research to induce effective bone restoration. This approach allows us to face the challenges that have so far hampered the clinical translation of the engineered cell-based

constructs, while collecting precious information about the complex mechanisms involved in bone tissue regeneration.

sub-aim 1) implantation of [REDACTED] constructs will provide us with more knowledge on the interaction of the immune system and bone formation. After this project, we will have a better idea on acceptable [REDACTED] that still allow for EBR. Clinical translation of the EBR approach will benefit from this project and will start to take shape.

sub-aim 2) exploring the possibility of using cell-free or devital scaffolds could help in the identification of the biological cues that are fundamental for the regenerative process. After this project, we will have more insight in the [REDACTED] of decellularization or devitalization of our samples.

sub-aim 3) comparison of the EBR process [REDACTED] will improve our understanding of the role of the [REDACTED]. If the process is reproducible [REDACTED], a validated higher throughput model will have been established, which may eliminate the need for a complex femur defect model. This could reduce the total number of animals required for future investigations [REDACTED]

sub-aim 4) novel approaches for increasing constructs size without compromising the regenerative potential of the construct will be developed. More insight will be obtained on what effect geometrical aspects can have on the remodeling process.

sub-aim 5) the effects of bioactive and degradative properties of (bio)materials on EBR remodeling process into bone tissue will be further elucidated. Also, more knowledge will be obtained on the effects of cells alone or combined with these materials on EBR.

Taken together, these results will generate knowledge that is essential to bring bone tissue regeneration closer to clinical translation. All studies will be compiled into conference abstracts and papers to be published in respected journals in the field.

Social relevance:

From the perspective of the patient, a lot can potentially be gained by the proposed studies. It has been estimated that every year 2.2 million bone grafts are implanted worldwide, with a related cost of \$2.5 billion (22). Currently available treatment strategies for non-healing bone defects include autograft and allograft transplantation. Autografts represent the best alternative because of their complete immunocompatibility and their osteoconductive and osteoinductive properties. However, this solution is far from optimal. Among its drawbacks are the limited bone availability, the need of an additional surgical procedure, which is closely related to donor site morbidity and the difficulties in modelling the graft into the desired shape (4). Likewise, allograft procedures are associated with limited bone supply. In addition, these grafts are not completely immunocompatible, pose possibility of disease transmission, and the grafting materials need to undergo chemical or physical treatment, which often undermine their osteoinductive properties (4, 5).

To overcome these limitations, a bone substitute is required. Biomaterials have been developed to successfully restore bone defects in patients. However, biomaterials cover only an estimated 20% of the market as they cannot be used to restore large, challenging bone defects. Therefore, we aim to develop bone regenerative strategies.

The proposed research can impact current patient care standards. Few cell-based regenerative constructs are nowadays translated to clinical application. Here, we can advance the field by designing the construct in such a way that it is more tailored towards clinical application. More specifically:

sub-aim 1) From a translational viewpoint, [REDACTED] offers many advantages. In fact, harvesting and culture of [REDACTED] cells will cost several weeks. This will [REDACTED] [REDACTED] for obtaining the stem cells. It will also [REDACTED] the [REDACTED] of the actual reconstructive surgery [REDACTED] with differentiating cells. Finally, the [REDACTED] patients. So, the use of [REDACTED] cells would provide the option to use cells that [REDACTED], and these could also be used to treat [REDACTED] patients, [REDACTED]. However, it is unknown if [REDACTED] the bone regenerative process.

sub-aim 2) Until recently, the endochondral dogma dictated that all implanted hypertrophic cartilage cells would die and disappear following the terminal hypertrophic differentiation route. This would be an interesting

feature, especially when considering the option of creating an off-the-shelf product for endochondral bone regeneration. However, at present it is not known which is the best method for devitalization without losing the construct's bioactivity (potential to induce EBR), or at which [REDACTED] should be carried out to still ensure optimal progression of the endochondral bone regenerative process. After this project, we will know if it is feasible to create an off-the-shelf product for the clinic, offering logistical benefits for the patient and surgeon.

sub-aim 3) Establishment of appropriate, yet predictive, pre-clinical models with reduced animal numbers [REDACTED] is desirable. Furthermore, these models could serve the [REDACTED] various translational options for EBR.

sub-aim 4) So far, the feasibility of EBR was established for constructs of up to 3 mm in at least one dimension. After this project, a better understanding of potential mechanisms for scale-up will be obtained. This is an important aspect of clinical translation because larger (cm-scale) constructs will be required for the human clinic.

sub-aim 5) Determination of the capacity of material and/or cell combination to induce EBR will result in optimized constructs for clinical use.

3.4 Research strategy

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

The overall design of the project and strategies are presented in the flowchart included in section 3.1.3. Following in vitro validation of cell/material combinations for their chondrogenic and hypertrophic capacity, they can be evaluated for endochondral bone regeneration in the subcutaneous and/or femur model in the rat. Both models can be applied as standalone models or combined into one animal. Outside of the present project, constructs resulting in bone regeneration in the rat models can proceed to large animal models, [REDACTED] to assess bone regeneration in large defects (these models are described in [REDACTED] project 'Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions').

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.

Screening for optimal parameters at subcutaneous locations [REDACTED] in flowchart of 3.1.3)
Overall, subcutaneous rodent models are required to screen for optimal construct composition in terms of cells and/or materials. The subcutaneous models offer the opportunity to reduce the overall number of animals required, as multiple samples (up to 6) can be simultaneously implanted in one animal. Although EBR was shown to take place at subcutaneous locations in immunocompromised rat models, the recapitulation of the process in immunocompetent animals [REDACTED] is largely unknown and subject to evaluation in this proposal.
Due to the relatively high number of samples that can be implanted at this location, the subcutaneous model is attractive for screening of the most promising construct compositions resulting from the *in vitro* experiments. For example, it can be used for comparing bone regeneration for different biomaterials and/or cells, after various predifferentiation [REDACTED] or following different devitalization strategies (13, 15).
More specifically, under general anaesthesia, up to six subcutaneous dorsal pouches will be created via 7-10 mm incisions. By limiting the total number of pouches to 6, the risk of pouch-to-pouch connection is also limited. Cartilaginous samples will be inserted into the pouches that are then intracutaneously closed by sutures. For [REDACTED] research questions [REDACTED]. To monitor bone formation, the rats will be included in the experiment for up to 12 weeks.

Bone regeneration at orthotopic sites (box femur rat in flowchart of 3.1.3)
Orthotopic models in mammals present a receptor site that closely mimics the natural implantation bed in the

human patient. These can consist of bone defects such as segmental defects in long bones (*e.g.* femur defect model in rats (23)). Bone regeneration in terms of bone union of the defect edges can be studied in these models. Here, a segmental femur defect model in rats can be used following subcutaneous optimization of the construct properties. This model represents a critical size defect, meaning that the defect will not heal by itself over time. More specifically, under general anaesthesia the femur will be exposed and a fixator will be screwed onto the bone. A segment of 5-6 mm will be sawed and removed. Here an implant or control will be inserted before closure of the tissue layers. Also, here, depending on the research question, [REDACTED]

[REDACTED] To monitor bone formation, the rats will be included in the experiment for up to 12 weeks.

The bone defect models could be combined with subcutaneous implantations where applicable to reduce the total amount of animals required.

Readouts

The *in vivo* responses in terms of bone formation can be monitored by micro-CT imaging in the rat models. For rats, fluorochrome injections can be an additional means to assess bone formation at various intervals during the experimental period without euthanizing animal at every time point (24). Further, to investigate the presence of inflammation [REDACTED] in an experiment, blood will be sampled regularly (for analysis of inflammatory markers via ELISA and of the nucleated-cell component via FACS). All other readouts (including end point micro-CT, immunohistochemistry of tissue development and [REDACTED] and gene expression analysis) are obtained post-mortem.

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.

The coherence has been detailed in section 3.1.3 beneath the flowchart. Briefly, all translational questions described in our sub-aims will be addressed in the subcutaneous and/or femur model in the rat. Once novel cell and/or material combinations have resulted in successful chondrogenesis in our established *in vitro* models, validation of endochondral potential can be performed in either rat model. For example, [REDACTED] [REDACTED] have been characterized for their chondrogenic potential in our *in vitro* assays, they can be included in the [REDACTED] experiments as under sub-aim 1.

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	Subcutaneous construct implantation in rats
2	Subcutaneous + orthotopic construct implantation in rats
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.1	Type of animal procedure Subcutaneous construct implantation in rats

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Experimental approach:

The aim of this project is to develop strategies to improve the characteristics of the currently available bone substitutes. Since different cell types, scaffold materials and growth factors will be optimized and combined in different ways, a screening of the most promising conditions needs to be performed. Subcutaneous pouches are the ideal model as they have been reported to be an adequate model to evaluate ectopic bone formation [13,15]. Besides, the model allows for the screening of several conditions at the same time, reducing the required amount of animals to a minimum. Further, the independence of the individual pouches will be maximized by limiting the total number of pouches to be created to six and by making one incision to form each pouch.

During the surgery, a maximum of six subcutaneous dorsal pouches will be created per rat. This model will be used for the subaims of the project (sub-aim 1 is not included as this is in the femur model, appendix 1.3-2):

- *Sub-aim 2:* exploring the potential of devitalized cell-based constructs to induce EBR
- *Sub-aim 3:* establishing a relevant preclinical model for EBR
- *Sub-aim 4:* evaluating the feasibility of EBR when increasing construct size
- *Sub-aim 5:* characterizing the EBR potential of various cell and/or material combinations

The criteria that need to be met *in vitro* before moving to this *in vivo* model are described in section 3.1.3 of the project description. The [REDACTED] will be chosen according to the specific research question, e.g. implantation of [REDACTED]

Outcomes:

Primary outcome measures

- For all the subaims the evaluation of ectopic bone formation *in vivo* will be the primary outcome. It will be assessed by microCT analysis, both at early and late timepoints.

Secondary outcome measures

- Bone formation: Fluorochrome labels might be administered at different timepoints after the implantation to establish the onset of bone formation. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained with the microCT. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis (e.g. H&E, safranin-O, TRAP staining, collagen type I).
- [REDACTED]: After explantation of the constructs, histological and immunohistochemical analysis will be performed to evaluate [REDACTED]. To prevent interference, the six pockets will be created performing six singular incisions, one for each implant. Further, previous studies already proved that the distance between pockets is sufficient to prevent interactions [13,15].

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

Animal procedures [13,15]

The animals are allowed at least one week of acclimatization before the start of the experiment. Open or filter top ([REDACTED]) cages will be selected according to the rat strain that is used and will be specified in the work protocol. The rats will always be housed in pairs, except for up to 3 days after the operation to allow for wound healing. The animals will be maintained on rodent chow and water *ad libitum*.

Anaesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia.

Pain management

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and daily until 3 days after surgery.

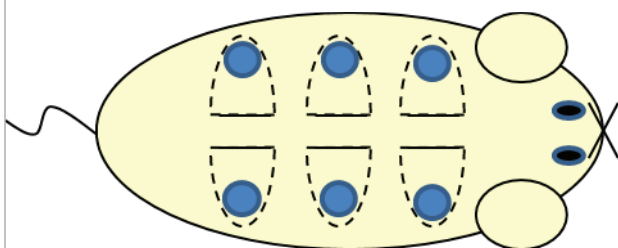
Antiseptic techniques

All operations will be performed under aseptic conditions. The surgeon will wear scrubs, gown, surgical mask, head cover and gloves. After shaving, the skin will be disinfected with ethanol and the surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive a dose of antibiotics before surgery. All the surgical equipment will be sterilize before the surgery.

Surgical technique

As shown in the figure below, a maximum of 6 dorsal pockets (dotted lines) are created, each by blunt dissection through one skin incision (from 7 to 10 mm, solid black lines at pocket) and filled with one implant (blue circles). The skin will be closed transcutaneously with resorbable sutures.

Total operation time per animal: 30 minutes



Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. The wounds will be examined daily for three days following surgery, thereafter weekly.

Bone regeneration measurements

Where applicable, fluorochromes will be administered by subcutaneous injection. For the *in vivo* bone formation analysis by microCT, rats are sedated using proper anaesthesia.

Total handling time per animal: 15 minutes

Euthanasia protocols

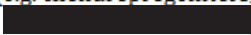
The rats will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. Methods will be selected based on their influence on vascular interference and compatibility with MICROFIL injection. The implants will be retrieved afterwards.

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

The required amount of animals has been selected based on previously published studies [13,15].

– Sub-aims 2, 3, 4 and 5:

The criteria required to start an *in vivo* experiment using this model are described in section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables that are taken into account in this aim.

Variables		
1) Biomaterials (e.g. hydrogels, decellularized tissues)	2) Progenitor cells (e.g. chondroprogenitors,  , mesenchymal stem cells)	3) Growth factors (e.g. chemoattractants, TGF β , BMPs)

In a typical experiment, these three variables are combined. For example, in an experiment based on the 3 listed variables a maximum of four different groups, including the controls conditions can be made (biomaterial only, biomaterial + progenitor cells, biomaterial + growth factor, biomaterial + progenitor cells+ growth factor). Two additional groups can be added in case sub-variables are included (e.g. two different progenitor cells type or two different growth factor concentration). Therefore, in each experiment, 4 to 6 different experimental conditions and controls can be included.

Based on previously published studies [13,15] the power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction has been performed. A sample size of maximum 6 implants per condition was defined to be able to detect a contrast of 30% with a power of 82%, a standard deviation of 0.13 and $\alpha=0.05$.

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 to 6 conditions * 6 (n)= 24 to 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 24 to 36 implants/ 6 implants per rat= 4-6 rats per experiment, considering a drop out of 5% of the implants (based on previous experience), 2 to 3 extra pockets might be required. For this reason a maximum of 5 to 7 animals are required per experiment.

The basic format of one experiment as outlined above will be repeated for different biomaterials (e.g. different decellularization protocols), cell types or stimuli. Further, the construct sized can be tuned in order to evaluate the feasibility of scaling up the constructs for EBR. As part of our ongoing research we expect to discover 1-2 promising new variables each year that will have completed the *in vitro* evaluations and have passed the go/no go criteria. So in total, for a five year period we would need to perform a maximum of 10 experiments, involving 5-7 rats each. This would amount to a total number of 70 rats. Furthermore, the exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

Total number of animals required for this project (including the drop out rate): 70

B. The animals

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

A total of 70 animals is required. The appropriate [REDACTED] will be chosen according to the [REDACTED] graft that is implanted during the experiment (e.g. biomaterial only [REDACTED] constructs) and they will be purchased from a registered breeder (e.g. Charles River). To have sufficient space between the pouches and avoid potential interference, skeletally mature rats are required. For this reason, only rats older than 12 weeks at the time of implantation will be used. Further, male and female rats show differences in bone metabolism [26,27], the use of a mixed population will cause a stronger increase in the observed variance. Since estrogen levels in female rats depend on stress and age [28] and can affect bone regeneration [29,30], male rats have been identified as the most suitable model.

Sub-aims 2,3,4 and 5:

- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] colony (e.g. Wistar) will be used when a broad screening is required. These rats are a suitable screening model for the analysis [REDACTED] and to test tissue regeneration in a cell-free approach.
- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] strain (e.g Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used when [REDACTED] bone marrow derived stem cells needs to be performed. Further, less variation can be expected when this animal model is used, compared to [REDACTED]. For this reason, valuable information can be collected using [REDACTED] during the screening phase.
- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] nude strain (RH-Foxn1^{rnu} rats) will be used when [REDACTED] animals are required, as [REDACTED] will be implanted (e.g. [REDACTED]).

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

No *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation or the combination of all the players involved in new tissue vascularization. Further [REDACTED] [REDACTED] engineered bone substitutes are implanted is of pivotal interest for clinical translation. For this reason, the use of an animal model is a necessity in order to test the regenerative potential of the developed constructs.

Reduction

The available *in vitro* methods to pre-screen cell behavior and cytocompatibility of the constructs will be part of the evaluations before progressing to animal studies, as shown in the flow chart in the appendix. This will ensure that only a promising selection of constructs will progress to the stage of implantation, thus reducing the number of animals used. By performing the first screening in a subcutaneous model, fewer animals are required

during the optimization process. Furthermore, 6 different conditions can be tested in one animal. In this way, only the promising substitutes will be tested in an orthotopic defect model (one per animal).

Refinement

- Subcutaneous model has been selected as an ideal model for this first screening phase because it allows to evaluate the regenerative potential of the implants (evaluating the ectopic bone formation). At the same time, it allows to compare multiple conditions within an animal, reducing the total amount of rats required.
- *In vivo* bone formation analysis will be performed using a microCT under adequate anaesthesia.
- Follow-up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.
- The researches will be trained in order to perform the implantation as atraumatic as possible.

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

To reduce animal fear, the researcher will get the animals used to their presence, practicing the handling procedures before the surgery. During surgery, respiration will be observed continuously and both before and after surgery the animals will be placed on a heating mat. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anaesthesia and paired once the wounds are closed. Standard housing conditions will be allowed post-op.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

N.A.

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.

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and twice per day until 3 days after surgery. Where applicable, additional local analgesics might be used. Adequate anaesthesia will be provided during the surgery and whenever required (*e.g.* during microCT scan)

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse events:

1) Skin irritation due to subcutaneous injections: mild (expected occurrence based on previous experiences: 5-10%)

2) Rats might bite and remove the stitches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wound closure (expected occurrence based on previous experiences: 5%)

3) Infection might occur at the surgical site: mild to moderate according to the infection (expected occurrence based on previous experiences: 1%)

Explain why these effects may emerge.

It has been observed that the animals might show some irritation due to the subcutaneous injections, especially when fluorochromes are used to assess bone formation. If this is the case, a different location will be used for the following injections. Rats might also bite and remove the sutures before the wounds are completely closed. This might cause a delay in wound closure and/or infection. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. Only in case of fall of the implant outside the pocket, the sample will be excluded. The other pockets from the same animals will still be included, unless the human end-point has been reached.

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

Animal's breathing will be regularly checked during and after surgery and every time anaesthesia is induced. The adequate depth of narcosis will be monitored by observing the animal's respiration and testing whether the animal is still awake before starting any procedure. Animals will be housed singularly for up to 3 days after the surgery to allow full wound closure. Tools used during the surgery are sterile, to prevent an infection to occur.

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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Complications that have been observed with this model in the past:

- Rarely, after implantation, a local infection occurs.
- Also, irritation after injections may occur.
- Rats might chew on sutures and/or implanted samples

The animal will be euthanized if scoring ≥ 2 in the following list: infection of surgical sites (2), visible spine or ribcage (2), panting (1), salivation (1), immobility (2), persistent tremors (2), persistent convulsions (2), self-

mutilation (2), pilo erection (2), abnormal posture (1).

Furthermore, the weight of the animals will be closely monitored and will be used as an additional indicator of animal (dis)comfort. A relevant unacceptable weight loss within a few days in comparison to its peers will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

5%

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').

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the eventual presence of filter top cages: mild
- 2) Animal discomfort due to the handling: mild
- 3) Animal discomfort due to the subcutaneous injections: mild
- 4) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 5) Animal discomfort due to the anaesthetic induction: mild
- 6) Animal discomfort and pain postoperatively due to the bone substitute implantation with adequate pain medication: mild
- 7) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: mild

Cumulative discomfort:
moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The implanted constructs need to be explanted for further analysis.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3.4.4.2	Type of animal procedure Subcutaneous + orthotopic construct implantation in rats

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.

Experimental approach:

The surgical procedure can include maximal two different types of defect per animal:

- 1) a six millimetre unilateral femoral defect (orthotopic defect)
- 2) a maximum of six subcutaneous dorsal pouches (ectopic defect)

The analysis of tissue engineered construct performance in an orthotopic defect is of pivotal interest as it allows evaluation of bone regeneration in a surgical site that closely mimics the clinical situation. To screen for optimal construct composition and bone tissue formation at ectopic locations, implantation of samples in subcutaneous pouches can be added to the model. The relevance of the subcutaneous model has been discussed previously in appendix 3.4.4.1.

The two defect types will be introduced during the same surgical session, without requiring an additional anaesthetic procedure. This will reduce the discomfort of the animal.

This model will be used for all the 5 sub-aims of the project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions".

The criteria that need to be met before moving to this *in vivo* model are described in the flow chart in the section 3.1.3. The required [REDACTED] will be chosen according to the need to implant [REDACTED] and to the specific research question.

Outcomes:

Primary outcome measures:

- The evaluation of bone regeneration will be the primary outcome. *In vivo* bone formation will be

assessed by microCT analysis.

Secondary outcome measures:

- Bone formation: Fluorochrome labels might be administered on different timepoints after the implantation to establish the onset of bone formation. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained with the microCT. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis (e.g. H&E, safranin-O, TRAP staining, collagen type I).
- [REDACTED] will be monitored by regular sampling of blood from the tail vein (max 1 ml per week). The serum and plasma will be used to evaluate the cellular component of the [REDACTED] (e.g. specific markers for [REDACTED] or evaluation the total [REDACTED] and [REDACTED] (e.g. [REDACTED]). This parameter will be considered only when no subcutaneous pockets will be added to the unilateral femoral defect. Further, after explantation of the constructs, histological and immunohistochemical analysis will be performed [REDACTED]

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

Animal procedures [13,15,23]

The animals are allowed at least one week of acclimatization before the start of the experiment. Open of filter top cages will be selected according to the rat strain that it is used and will be specified in the work protocol (e.g. [REDACTED] will be used in case of [REDACTED]). The rats will be always housed in pairs, beside up to 3 days after the operation to allow the wounds healing. The animals will be maintained on rodent chow and water ad libitum.

Anesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia.

Pain management

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and daily until 3 days after the surgery.

Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically. The surgeon will wear gown, surgical mask, head cover and gloves. After shaving, the skin will be disinfected with ethanol and surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive a single dose of antibiotics before surgery. All the surgical equipment will be sterilize before the surgery.

Surgical technique

Unilateral orthotopic defect: The surgical procedure has already been successfully performed and was described in detail previously [23]. Briefly, the femur is exposed through a lateral incision of the skin and division of the underlying fascia. A plate is fixed to the anterolateral plane of the femur using three proximal and three distal screws. Periosteum is removed over approximately 8 mm of the mid-diaphyseal region before removal of 6 mm cortical bone. Bone will be removed with a tailor-made saw guide and a wire and the bone substitute is placed press-fit into the defect site. After insertion of the implant into the defect, the fascia and skin are sutured in layers using resorbable sutures.

Total operation time per animal: 45 minutes-1 hour

Subcutaneous defect: A maximum of 6 dorsal pouches are each created by blunt dissection (from 7 to 10 mm) through one skin incision and filled with one implant. The skin will be closed transcutaneously with resorbable sutures. See appendix 3.4.4.1 for more details.

Total operation time per animal: additional 15-30 minutes

Postoperative care

The rats are postoperatively treated with the analgesic as previously described. They will be housed separately until wounds are closed (typically 1-3 days). After, they will be housed in pairs, keeping the same pairs before

and after surgery. In case of failing sutures, the wound will be cleaned, trimmed and re-sutured under adequate anaesthesia. They will be examined and weighed daily for three days following surgery, thereafter weekly.

Bone regeneration measurements

Where applicable, fluorochromes will be administered by subcutaneous injection. For the *in vivo* bone formation analysis by microCT, rats are sedated using proper anaesthesia. When required, blood samples will be collected from the tail vein (max 1ml per week) before scanning, while the rats are already under anaesthesia. This will reduce the animal discomfort.

Total handling time per animal: 15 minutes for the microCT + 15 additional minutes in case of blood sampling

Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. The implants will be retrieved afterwards.

In case the [REDACTED] required [REDACTED] when [REDACTED] are performed can not be purchased, the isolation will be performed by the researcher using an already established protocol [25]. The animals will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU (usually CO₂ asphyxiation) prior to femur and tibia harvest for mesenchymal stem cells isolation.

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

The required amount of animals has been selected based on a previously published study [23].

- *Subaim 1: studying the effects of [REDACTED] for EBR*

The go/no go criteria that need to be met to use this model are described in the section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables is presented that are taken into account in this aim:

Variables	Control Conditions
[REDACTED]	Carrier

In a typical experiment, the three variables displayed above can be combined with a maximum of two control conditions. Therefore, in each experiment, a maximum of 5 different conditions will be included. Further, a total of two different time points, one early and one late, can be selected.

The primary output parameter is bone regeneration. Based on previously published studies [23] and [REDACTED], a power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction has been performed. A sample size of 9 implants per condition was defined to be required to detect a contrast of 30% with a power of 80%, a standard deviation of 0.17 (based on [20]) and $\alpha=0.05$.

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 5 conditions * 9 (n)= 45 implants in total per experiment.

Number of animals required: 45 implants/ 1 implant per rat= 45 rat per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 5 extra animals are required per experiment.

To understand whether the bone formation at 12 weeks is correlated to [REDACTED] an early timepoint at week 1 is included. This

is a different, secondary outcome measure and as such has a different power calculation. A power analysis based on the values [REDACTED] obtained during a pilot study (unpublished data) has been carried out. In particular, performing a one-way anova with a Tukey/HSD post hoc correction, a contrast of 31.5% can be detected with a power of 79%, a standard deviation of 0.13 and $\alpha=0.05$ when the sample size is 5 rats.

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 5 conditions * 5 (n)= 25 implants in total per experiment.

Number of animals required: 25 implants/ 1 implant per rat= 25 rat per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 3 extra animals are required per experiment.

Further, the difference in [REDACTED] to the implant will be evaluated qualitatively through histology [REDACTED]

We expect to perform the basic format of one experiment as outlined above twice in the five year period. Therefore, in total, for a five year period we would need a maximum total number of 156 rats. The exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

- *Sub-aims 2 and 3: exploring the potential of devitalized cell-based constructs to induce EBR and establishing a relevant preclinical model for EBR*

The go/no go criteria that need to be met to use this model are described in the section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the possible variables is presented that are taken into account in this aim:

Variables		Control Conditions	
Devitalization timepoint I	Devitalization timepoint II	Vital implant timepoint I	Vital implant timepoint II

For *sub-aim 3* the results obtained in [REDACTED] will be compared with [REDACTED]. The sample size has been calculated considering the orthotopic defects as the limiting element, since it is possible to create a single femoral defect per animal but up to 6 subcutaneous pockets.

Comparably to *sub-aim 1*, the primary outcome is bone formation. In each experiment, 4 different experimental conditions and controls can be included. Based on a previously published study [23] and [REDACTED], a power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis, a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction was assumed for the power calculations. A sample size of 9 implants per condition is required for our desired detection of a contrast of 30%, with a power of 84%, a standard deviation of 0.17 (for microCT outcome in study [3]) and $\alpha=0.05$. Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 conditions * 9 (n)= 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 36 implants/ 1 implant per rat= 36 rat per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 4 extra animals are required per experiment.

We expect to perform the basic format of one experiment as outlined above maximum twice in the five year period. Therefore, in total, for a five year period we would need a maximum total number of 80 rats. Since *sub-aims 2 and 3* can be tested within the same experimental setting (*e.g.* implanting in subcutaneous pockets the same construct tested in the femur defect), no additional animals are required. The exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

- *Sub-aims 4 and 5: evaluating the feasibility of EBR when increasing construct size and characterizing the EBR potential of various cell and/or material combinations*

The go/no go criteria that need to be met to use this model are described in the section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables is presented that are taken into account in this aim:

Variables		
1) Biomaterials (e.g. hydrogels, decellularized tissues)	2) Progenitor cells (e.g. chondroprogenitors, [REDACTED] mesenchymal stem cells)	3) Growth factors (e.g. chemoattractants, TGF β , BMPs)

The sample size has been calculated considering the orthotopic defects as the limiting element, since it is possible to create a single femoral defect per animal but up to 6 subcutaneous pockets. In a typical experiment, the three variables in the table are combined. For example, in an experiment based on the 3 listed variables, a maximum of four different groups, including the control condition can be made (biomaterial only, biomaterial + progenitor cells, biomaterial + growth factor, biomaterial + progenitor cells+ growth factor). Therefore, in each experiment, 4 different experimental conditions and controls can be included.

Based on a previously published study [23] and on a pilot previously performed [REDACTED], a power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis, a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction was assumed for the power calculations. A sample size of 9 implants per condition is required for our desired detection of a contrast of 30%, with a power of 84%, a standard deviation of 0.17 (for microCT outcome in study [3]) and $\alpha=0.05$.

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 conditions * 9 (n)= 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 36 implants/ 1 implant per rat= 36 rats per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 4 extra animals are required per experiment.

The basic format of one experiment as outlined above will be repeated for different biomaterials (e.g. different decellularization protocols), cell types or stimuli. We expect to develop a variable every year that could be considered for *in vivo* testing. So in total, for a five year period we would need to perform a maximum of 5 experiments, involving 40 rats each (for calculation, please see the one under *subaim 4 and 5*). This would amount to a total number of 200 rats. Furthermore, the exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

In case the [REDACTED] can not be purchased, an isolation procedure is required. Based on previous experience [25], 10 femurs are required to isolate enough cells to perform the experiments listed in *subaim 1*. This calculation has been based on the average number of cells that can be isolated from a single femur and the total cell yield that can be achieved after the *in vitro* expansion of the primary isolated cells. In case [REDACTED], 20 femurs will be required. As both femurs from one animal can be used for this procedure, 10 extra rats could be required for stem cell isolation.

Total number of animals required for this project (including the estimated drop-out rates): 446 (156+80+200+10)

B. The animals

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

A total of 446 animals is required. The appropriate animal strain will be chosen according [REDACTED] during the experiment (e.g. biomaterial only [REDACTED] constructs) and they will be purchased from a registered breeder (e.g. Charles River). To avoid loosening of the fixation femur plate due to the growing of the rats, skeletally mature animals are required. For this reason, only rats older than 12 weeks at the time of implantation will be used. In addition, male rats are preferred, as the smaller size of female rats increases the difficulties of the surgical procedure. Further, male and female rats show differences in bone metabolism [26,27], the use of a mixed population will cause an increase in the observed variance. Since estrogen levels in female rats depend on stress and age [28] and can affect bone regeneration [29,30], male rats have been identified as the most suitable model.

Sub-aim 1:

- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] rat strain (e.g. Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used. [REDACTED] animals are known to be suitable for the [REDACTED] transplantation, as there will be [REDACTED] [31]. To study the [REDACTED] rats will be used [REDACTED]
- Male rats older than 12 to 16 weeks selected from an [REDACTED] nude strain (RH-Foxn1^{rnu} rats) will be used when [REDACTED] animals are required. They will be eventually used as positive control, as it has already been proved that bone tissue regeneration or ectopic bone formation occurs in this model [REDACTED] [15,23]

Sub-aims 2,3,4 and 5:

- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] rat strain (e.g. Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used. These rats have been identified as a suitable, reliable and reproducible model when [REDACTED] are needed.
- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] nude strain (RH-Foxn1^{rnu} rats) will be used when [REDACTED] animals are required. This model is the best option if the influence of the [REDACTED] is not the main research question when [REDACTED] are implanted.

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

No *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation or the combination of all the players involved in the immune reaction. For this reason, the use of an animal model is fundamental in order to test the regenerative potential of the developed constructs.

Reduction

The available *in vitro* methods to confirm chondrogenesis and hypertrophy of the constructs and the results obtained in the rat models will be part of the evaluations before progressing to large animal studies, as shown in the flow chart in 3.1.3. This will ensure that only a promising selection of constructs will progress to the stage of implantation, thus reducing the number of animals used. Further, by combining the femoral defect study with

additional subcutaneous implants, fewer animals are used to make a more efficient comparison of various parameters.

Refinement

- The unilateral critical size defect model has been selected as an ideal model for evaluation of bone tissue regeneration, as it will allow implantation at the orthotopic location, which is relevant due to its resemblance to the clinical setting. In fact, also in the intended future human surgical procedure, the implanted construct will be in direct contact with the patient's bone edges.
- *In vivo* bone formation analysis will be performed using a microCT under adequate anaesthesia.
- Follow-up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.
- The researches will be trained in order to perform the implantation as atraumatic as possible.

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

To reduce animal fear, the animals will get used to the researcher and to the handling procedure before the surgery. During surgery, respiration will be observed continuously and both before and after surgery the animals will be placed on a heating mat. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anaesthesia and paired once the wounds are closed. Standard housing conditions will be allowed post-op.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

N.A.

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.

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and twice per day until 3 days after surgery. Where applicable, additional local analgesics might be used. Adequate anaesthesia will be provided during the surgery and every time needed (*e.g.* during microCT scan).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse events:

- 1) Skin irritation due to subcutaneous injections: mild (expected occurrence based on previous experiences: 5-10%)
- 2) Removal of the stitches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wounds closure (expected occurrence based on previous experiences: 5%)
- 3) Infection might occur at the surgical site: mild to moderate according to the infection (expected occurrence based on previous experiences: 5%)
- 4) PEEK plate failure: moderate pain, reducing the mobility of the animal (expected occurrence based on previous experiences: 10%)
- 5) Damage of the tail in case of repeated attempt to obtain blood samples from the tail vein (expected occurrence based on previous experiences: 5%)

Explain why these effects may emerge.

It has been reported before that several subcutaneous injection might cause skin irritation, especially when fluorochromes are used to assess bone formation. If this will be the case, a different location will be used for the following injections. Rats might also bite and remove the sutures before the wounds are completely closed. This might cause a delay in wound closure and/or infection. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. Further, as the rat's movement is not restricted after the surgery to prevent unnecessary discomfort, a failure of the PEEK plate might occur (<10%). To reduce to the minimum the possibility this adverse event might occur, 3 proximal and 3 distal screws will be used to stabilize the defect site.

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

Animals will be regularly checked both during and after the surgery and every time anaesthesia is induced. The adequate depth of narcosis will be guaranteed observing the animal respiration and testing whether the animal is still awake before starting any procedure. Animals will be housed singularly for up to 3 days after the surgery to allow the wounds closure. If an unexpected adverse event will occur, the adequate actions will be taken (see the section below). To avoid infections, all the surgical tools will be sterilized and the surgery will take place in aseptic conditions (see above). Finally, to avoid damage of the tail, a maximum of 3 attempts per timepoint can be performed in order to obtain the blood samples.

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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Complications that have been observed with this model in the past:

- Rarely, after implantation, a local infection occurs.
- Also, irritation after injections may occur.
- Rats might chew on sutures and/or implanted samples

- PEEK plate failure

Seldom, after implantation, the femoral fixation plate might loosen or a local infection might occur. The animal will be euthanized if scoring ≥ 2 in the following list: infection of surgical sites (2), visible spine or ribcage (2), panting (1), salivation (1), immobility (2), persistent tremors (2), persistent convulsions (2), self-mutilation (2), pilo erection (2), abnormal posture (1).

Furthermore, the weight of the animals will be closely monitored and will be used as an additional indicator of animal (dis)comfort. A relevant unacceptable weight loss within a few days in comparison to its peers will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely (<10%)

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').

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the eventual presence of filter top cages: mild
- 3) Animal discomfort due to the handling: mild
- 4) Animal discomfort due to the subcutaneous injections: mild
- 5) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 6) Animal discomfort due to the anaesthetic induction with isoflurane: mild
- 7) Animal discomfort and pain postoperatively due to the bone substitute implantation with adequate pain medication: mild to moderate
- 8) Animal discomfort after blood sampling: mild
- 9) Animal discomfort due to microCT scan under anaesthesia: mild
- 10) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: mild

Cumulative discomfort:

Moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The implanted constructs need to be explanted for further analysis.

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

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

☒ Yes

Reference list:

1. Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. *The Lancet*. 1999;353:S28-S9.
2. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):635-45.
3. Liu Y, Lim J, Teoh S-H. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 2013;31(5):688-705.
4. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*. 2005;36(3, Supplement):S20-S7.
5. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, et al. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1995;77(2):214-24.
6. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):46-62.
7. Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers LB, Alblas J, Dhert WJ. Modulating endochondral ossification of multipotent stromal cells for bone regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(4):385-95.
8. Farrell E, van der Jagt OP, Koevoet W, Kops N, van Manen CJ, Hellingman CA, et al. Chondrogenic priming of human bone marrow stromal cells: a better route to bone repair? *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(2):285-95.
9. Janicki P, Kasten P, Kleinschmidt K, Luginbuehl R, Richter W. Chondrogenic pre-induction of human mesenchymal stem cells on beta-TCP: enhanced bone quality by endochondral heterotopic bone formation. *Acta Biomater*. 2010;6(8):3292-301.
10. Jukes JM, Both SK, Leusink A, Sterk LM, van Blitterswijk CA, de Boer J. Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(19):6840-5.
11. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(10):3254-66.
12. Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, et al. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(16):7251-6.
13. Gawlitta D, Benders KE, Visser J, van der Sar AS, Kempen DH, Theyse LF, et al. Decellularized cartilage-derived matrix as substrate for endochondral bone regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2015;21(3-4):694-703.
14. Farrell E, Both SK, Odorfer KI, Koevoet W, Kops N, O'Brien FJ, et al. In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:31.
15. Visser J, Gawlitta D, Benders KE, Toma SM, Pouran B, van Weeren PR, et al. Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. *Biomaterials*. 2015;37:174-82.
16. Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers LB, Alblas J, Dhert WJA. Modulating Endochondral Ossification of Multipotent Stromal Cells for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(4):385-95.
17. Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper RV, de Bruin A, van Nostrum CF, Vermonden T, et al. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(epsilon-caprolactone). *Biomaterials*. 2012;33(17):4309-18.
18. Boot W, Moojen DJ, Visser E, Lehr AM, De Windt TS, Van Hellemond G, et al. Missed low-grade infection in suspected aseptic loosening has no consequences for the survival of total hip arthroplasty. *Acta orthopaedica*. 2015;86(6):678-83.
19. Boere KW, Visser J, Seyednejad H, Rahimian S, Gawlitta D, van Steenberg M, et al. Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplast to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs. *Acta Biomater*. 2014;10(6):2602-11.
20. Prins HJ, Braat AK, Gawlitta D, Dhert WJ, Egan DA, Tjissen-Slump E, et al. In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem cell research*. 2014;12(2):428-40.

21. Fedorovich NE, Kuipers E, Gawlitta D, Dhert WJ, Alblas J. Scaffold porosity and oxygenation of printed hydrogel constructs affect functionality of embedded osteogenic progenitors. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(19-20):2473-86.
22. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012;40(8):706-18.
23. van der Stok J, Koolen MK, Jahr H, Kops N, Waarsing JH, Weinans H, et al. Chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects. *European cells & materials*. 2014;27:137-48; discussion 48.
24. van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(2):209-17.
25. Gonzalez-Vazquez, A., et al., Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 2014. 10(6): p. 2824-33.
26. Sample, SJ., et al., Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PloS one*. 2012;7(9):e43215.
27. Strube, P., et al., Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*. 2009 Dec;45(6):1065-72.
28. Arakawa, K., et al., Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.
29. Hong, L., et al., Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *J steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Apr;114(3-5):180-5.
30. Calis, M., et al., Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014 Apr;133(4):499e-510e.
31. Chatterjea, A., et al., Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. *J Cell Mol Med*, 2014. 18(1): p. 134-42.
32. Peche, H., et al., Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant*, 2006. 6(7): p. 1541-50.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020172465
Bijlagen
2

Datum 4 juli 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 juli 2017. Het gaat om uw project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020172465. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

4 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020172465

Datum:
4 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172465

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



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

Datum:

4 juli 2017

Aanvraagnummer:

DEC150020172465

Over uw project

Geplande startdatum:

1 september 2017

Geplande einddatum:

1 september 2022

Titel project:

Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions

Titel niet-technische samenvatting:

Strategieën voor botregeneratie vanuit kraakbeen in mond-kaak en aangezichtschirurgische ingrepen

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.541,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

3 juli 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020172465
Bijlagen
2

Datum 4 juli 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 4 juli 2017
Vervaldatum: 3 augustus 2017
Factuurnummer: 172465
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020172465	€ 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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.543.012
2. Titel van het project : Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions
3. Titel van de NTS : Strategieën voor botregeneratie vanuit kraakbeen in mond- kaak en aangezichtschirurgische ingrepen
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer :
5. Contactgegevens DEC
 - Naam DEC : DEC Utrecht
 - Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
 - Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 22-05-2017
 - ☐ aanvraag compleet:
 - ☒ in vergadering besproken: 31-05-2017
 - ☐ anderszins behandeld:
 - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 06-06-2017/07-06-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 - ☐ aanpassing aanvraag:
 - ☒ advies aan CCD: 03-07-2017
7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.
8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 06-06-2017
- Datum antwoord: 07-06-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
Bijlage 2
 - K. Classificatie van ongerief: De immunodeficiënte dieren (1) kunnen hier verwijderd worden omdat ze geen ongerief ervaren.
Dit is aangepast.
 - Tevens verwijst de DEC naar de discussie/vragen vermeld bij projectvoorstel 2017.I.543.008, *Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Door trauma, aangeboren afwijkingen of het verwijderen van tumoren, kunnen patiënten botweefsel missen. Momenteel wordt dit botweefsel vervangen door bot elders uit het lichaam, maar hierdoor ontstaat er een extra defect en bovendien vergt het een langdurige operatie. Een mogelijke oplossing hiervoor is het maken van botweefsel in het laboratorium.
Tot nu toe zijn er verschillende strategieën voor botregeneratie onderzocht, waarbij geprobeerd is om de meest effectieve celpopulatie te combineren met het ideale dragermateriaal en de optimale stimulatiefactoren. De belangrijkste uitdaging daarbij is het opschalen van weefselgrootte naar een klinisch relevante dimensie. Onderzoekers proberen dit nu op te lossen door: 1) vasculaire structuren in de constructies te introduceren, of door 2) botvorming vanuit kraakbeen te stimuleren, de endochondrale route naar botvorming. Het onderhavige projectvoorstel richt zich op de tweede aanpak.
Endochondraal bot wordt gevormd uit een kraakbeenachtige mal dat mineraliseert en, na het optreden van vascularisatie, wordt omgezet in botweefsel. Dit type botvorming vindt ook plaats

in groeischijven en bij genezing van een fractuur. Het endochondrale proces kan worden nagebootst door chondrogenese (kraakbeenvorming) te stimuleren in, uit beenmerg afkomstige, multipotente mesenchymale stromale cellen (MSC's). Er is reeds aangetoond dat implantatie van kraakbeenweefsel uit MSC's omgezet kan worden in botweefsel. In dit project zullen stappen worden genomen om deze aanpak te vertalen naar de klinische praktijk: kunnen [REDACTED] gebruikt worden, welke cellen en materialen kunnen het beste gebruikt worden en hoe kan hiervan een groot implantaat gemaakt worden.

Er zal worden gestart met een *in vitro* studie (geen onderdeel van het projectvoorstel), waarbij gekeken wordt of de cellen opeenhopen in bolvormig kraakbeenweefsel (pellets) en of single cellen [REDACTED] gekweekt kunnen worden in biomaterialen, zoals hydrogelen. Wanneer chondrogenese en hypertrofie van de cellen in pellets of in biomaterialen is bevestigd, wordt overgegaan naar het subcutane en het femur rattenmodel. In het subcutane rattenmodel kan de omzetting van kraakbeenweefsel in botweefsel worden gevalideerd. Het is ook geschikt als screeningsmodel om de optimale constructsamenstelling te bepalen aangezien meerdere samples van verschillende samenstelling geïmplantéerd kunnen worden in één dier. In het femur rattenmodel kan botvorming op een orthotopische locatie (femur) worden bepaald, wat het best overeenkomt met het implantaatbed bij een patiënt. Botregeneratie in termen van het hechten van het implantaat aan het omliggende botweefsel kunnen worden bestudeerd in dit model. De beide modellen kunnen simultaan worden uitgevoerd en kunnen zelfs in één dier worden gecombineerd.

De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 1 uit de "Handreiking Invulling Definitie Project". De DEC is derhalve van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om endochondrale botregeneratie (EBR) te vertalen naar een (maxillofaciale) klinisch relevante toepassing. Hiertoe: 1) worden de effecten van het gebruik van [REDACTED] voor EBR bestudeerd, 2) wordt de potentie van gedevitaliseerde, op cellen gebaseerde constructen om EBR te induceren onderzocht, 3) wordt een relevant preklinisch model voor EBR opgezet, 4) wordt de haalbaarheid van EBR bij het vergroten van de constructiegrootte onderzocht en 5) worden verschillende potentiële cel- en/of materiaalcombinaties voor EBR gekarakteriseerd. Het uiteindelijke doel van het project is het vervangen van botweefsel in de kaak en het aangezicht door middel van botweefsel uit het laboratorium. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep/patiënten en de onderzoekers. 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 ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden.
- Zoals bij C1 vermeld, is het vervangen van botweefsel door bot elders uit het lichaam een ingreep die vaak gepaard gaat met letsel op de plek waar het bot vandaan wordt gehaald. Indien er een goed werkende combinatie van cellen, biomaterialen en/of groeifactoren wordt gevonden, kan dit gebruikt worden voor het creëren van kraakbeen en daarmee ook botweefsel. Patiënten zouden dan in de toekomst eenvoudiger, zonder extra chirurgische ingreep en zonder bijkomende defecten als gevolg van het verwijderen van botweefsel, behandeld kunnen worden. Voor de onderzoekers geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Wetenschappelijke reputatie kan door de onderzoeker 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.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het doen van onderzoek naar botregeneratie en de PI specifiek met diermodellen voor onderzoek naar botregeneratie. Daarnaast is er, zowel binnen als buiten de instelling, samenwerking met groepen die zich eveneens bezighouden met botregeneratie. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (zie hiervoor ook de tekst bij C1).

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)

- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Alleen na de operatie worden de dieren enkele dagen solitair gehuisvest totdat de wond geheeld is.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De experimentele handelingen aan de dieren zullen (gezien hun aard) licht tot matig ongerief veroorzaken. Cumulatief is voor beide bijlagen het ongerief ingeschat als matig.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door het subcutaan implanteren van de scaffolds en het aanbrengen van een defect in de femur.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. In bijlage 1 wordt verwacht dat maximaal 5% van de dieren het humane eindpunt bereikt. Voor bijlage 2 is dat minder dan 10%. De dieren in beide bijlagen zullen nauwlettend gemonitord worden op algeheel welzijn, waarbij met name wordt gelet op een infectie van de chirurgische wond(en), hijgen, speekselvloed, immobiliteit, aanhoudend beven, aanhoudende krampen, zelfmutilatie, pilo erectie en abnormale houding en onacceptabel/langdurig gewichtsverlies (zichtbare wervelkolom of rib) ten opzichte van soortgenoten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor aanvang van de *in vivo* studies wordt *in vitro* onderzoek verricht, waarbij de biomaterialen, cellen en groeifactoren getest worden op de meest optimale combinaties. Omdat de systemische effecten van de implantaten, zoals de invloed op de aantrekking van stamcellen uit de bloedstroom en het beenmerg, en de ingroei en binding van het implantaat met het omliggende botweefsel, alsook de snelheid van omvorming naar nieuw bot, waarbij cellen nodig zijn vanuit het lichaam, niet *in vitro* na te bootsen zijn is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Daarnaast zijn diermodellen nodig om te zien of de ontwikkelde botweefsels de krachten, die in een bewegend dier/mens aanwezig zijn, kunnen weerstaan. De *in vitro* studies kunnen derhalve de kwaliteit van het implantaat in de patiënt onvoldoende voorspellen.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. Daarnaast wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen met behulp van go/no-go momenten waarbij alleen de best werkende *in vitro* combinatie *in vivo* wordt getest. Door de eerste screening in het subcutane model te verrichten, zijn er minder dieren nodig tijdens het optimalisatieproces en kunnen in dit model zes verschillende condities in één dier worden getest. Op deze manier worden alleen de meestbelovende substituten getest in het orthotopische model. Verder zijn door het orthotopische model te combineren met additionele subcutane implantaten, minder dieren nodig om een efficiënte vergelijking te maken tussen de verschillende parameters.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden goed gemonitord om ongerief tijdig te kunnen vaststellen en onnodig lijden te voorkomen en zullen ze worden geëuthanaseerd zodra ze één van de vooraf nauwkeurig gedefinieerde humane eindpunten bereiken. De onderzoekers hebben ofwel ervaring met het uitvoeren van de chirurgische handelingen of worden hier vooraf in getraind o.a. met behulp van kadavermateriaal. In bijlage 1 wordt het s.c. rattenmodel gebruikt omdat het een goede screening van de implantaten toestaat en er verschillende combinaties van implantaten in één dier geplaatst kunnen worden. In bijlage 2 is voor het femur rattenmodel gekozen omdat het een ideaal model is om botweefselregeneratie in te bestuderen, vanwege het aanbrengen van de implantaten op de orthotopische locatie, waarmee het de klinische situatie het beste benadert.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Omdat mannelijke en vrouwelijke ratten een ander botmetabolisme hebben, wordt de voorkeur gegeven aan het gebruik van één sekse. Het gebruik van beide seksen zal leiden tot een grotere variatie en het gebruik van meer dieren. Aangezien stress en leeftijd invloed hebben op het oestrogeen niveau en oestrogenen van invloed zijn op botregeneratie, gaat in bijlage 1 de voorkeur uit naar het gebruik van mannelijke muizen. In bijlage 2 gaat eveneens de voorkeur naar het gebruik van mannelijke ratten omdat de femur van vrouwtjes ratten kleiner is en dat de chirurgische procedure bemoeilijkt. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood voor histologisch onderzoek van de constructen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het vertalen van endochondrale botregeneratie (EBR) naar een (maxillofaciale) klinisch relevante toepassing, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief.
Echter, indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden zal dit project er toe bijdragen dat patiënten die botweefsel missen in de kaak of het aangezicht, een transplantatie kunnen ondergaan van, in het laboratorium, endochondraal gegroeid botweefsel, zonder de nadelen die een bottransplantatie uit een ander deel van het lichaam van de patiënt met zich meebrengt. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Wanneer het de onderzoekers bovendien lukt om botvorming vanuit kraakbeen te stimuleren, kan in de toekomst wellicht ook de vertaalslag worden gemaakt naar andere weefsels en organen.
Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat, hoewel de experimenten leiden tot een aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren, het in het laboratorium ontwikkelen van endochondraal gegroeid botweefsel, ter vervanging van een bottransplantatie elders uit het lichaam, een substantieel belang vertegenwoordigt dat opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

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.
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1150020172465

Bijlagen

1

Datum 20 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 4 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" met aanvraagnummer AVD1150020172465. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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 "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 juli 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:

20 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020172465

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
na



ir. [Redacted]

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" met aanvraagnummer AVD1150020172465, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. 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 4 juli 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 3 juli 2017, ontvangen op 4 juli 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Subcutaneous construct implantation in rats				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	70	Matig	
3.4.4.2 Subcutaneous + orthotopic construct implantation in rats				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	446	Matig	

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

Aanvraagnummer:

AVD1150020172465

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:

AVD1150020172465

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:

AVD1150020172465

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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