



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|---|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 11500 |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | UMC Utrecht |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | Immune System Involvement in Sex-Specific Vulnerability to Prenatal Stress
NL: Stress of ziekte tijdens de zwangerschap: waarom is dat erger voor zoontjes dan voor dochtertjes? |

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

Fundamenteel onderzoek

Translationeel of toegepast onderzoek

Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie

Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier

Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort

Hoger onderwijs of opleiding

Forensisch onderzoek

Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Uit dierexperimenteel onderzoek is gebleken dat prenatale stress schadelijker is voor mannelijke dan voor vrouwelijke nakomelingen (Schroeder et al 2013; Xuan and Hampson 2014). Ook wordt het steeds duidelijker dat prenatale stress een belangrijke rol speelt in de etiologie van polygenetische neuro-ontwikkelingsstoornissen zoals autisme spectrum disorders (ASD) (Kinney et al 2008; Atladotir et al., 2010) – stoornissen waaraan veel meer mannen dan vrouwen lijden (Miles & Hillman, 2000).

Dat er veel meer mannen met een ASD zijn dan vrouwen is een van de bekendste eigenschappen van de stoornis, maar hoe dat sekseverschil tot stand komt is verre van duidelijk. Ook andere ontwikkelingsstoornissen komen vaker voor bij mannen dan bij vrouwen (bv. ADHD, Tourette syndroom, dyslexie, conduct disorder, specific language disorder (SLI)). Mochten we de oorsprong van het sekseverschil in ASD en andere ontwikkelingsstoornissen beter begrijpen dan zouden we de stoornissen als geheel beter begrijpen. De belangrijkste oorzaken voor het sekseverschil worden gezocht in genen die seksespecifiek worden afgeschreven, in prenatale testosteron concentratie die van nature hoger is in jongetjes dan meisjes en prenatale stress (zie Schaafsma & Pfaff 2014 voor een review). Lang werd gedacht dat ASD verklaard zou kunnen worden d.m.v. genetica, maar het wordt steeds duidelijker dat omgevingsfactoren, zoals prenatale stress, een net zo'n belangrijke, zo niet belangrijker rol spelen (Hallmayer et al 2011). Als we begrijpen hoe het kan dat mannetjes vatbaarder zijn voor de negatieve gevolgen van prenatale stress (maternale immunosuppressie door ziekte of stress) dan vrouwtjes dan geeft dit belangrijke nieuwe aanknopingspunten voor onderzoek naar de etiologie van verschillende hersenstoornissen die een seksespecifieke incidentie laten zien.

Dit onderzoek test onze hypothese dat [REDACTED], een cruciale rol spelen in de seksespecifieke kwetsbaarheid voor prenatale stress. In volwassenen [REDACTED].

Over de functie van [REDACTED] cellen is nog bijna niks bekend, al is het door [REDACTED] erg onwaarschijnlijk dat het dezelfde functie uitvoert als in het volwassen organisme. De periode van [REDACTED] komt overeen met de periode van de sterke

toename van testosteron die seksuele differentiatie van de hersenen veroorzaakt. [REDACTED]

Deze studie, die gefinancierd wordt met een Marie Skłodowska-Curie research grant van de Europese Unie, onderzoekt of mannetjes extra kwetsbaar zijn voor prenatale stress [REDACTED]

[REDACTED]. Mannetjes krijgen dus bij wijze van spreken een dubbele hit [REDACTED]), terwijl vrouwtjes slechts 1 hit te verduren krijgen (door prenatale stress). Deze dubbele hit zou kunnen leiden tot overactivatie [REDACTED]

Meer specifiek zal worden onderzocht of een dubbele hit (prenatale stress en masculinisatie) de epigenetische status van promotors van relevante genen in [REDACTED] seksespecifiek verandert en daardoor de expressie van het DNA structureel verandert. Ook wordt bekeken of [REDACTED] (tijdens masculinisatie) en prenatale stress. [REDACTED]

[REDACTED] Aangezien deze studies niet in mensen uitgevoerd kunnen worden kiezen wij voor het gebruik van een muismodel. Muizen worden veel gebruikt in onderzoek naar neuro-ontwikkelingsstoornissen en zorgt er dus voor dat onze resultaten goed interpreteerbaar zijn in het veld van neuro-ontwikkelingsstoornissen.

Indien de hypothesen bevestigd worden hebben we een potentieel belangrijk mechanisme blootgelegd dat kan verklaren hoe prenatale stress schadelijker voor mannen dan voor vrouwen is.

Om de hypothesen te testen zullen wij in muizen [REDACTED] en bekijken of [REDACTED] voldoende en noodzakelijk is om de seksespecifieke kwetsbaarheid voor prenatale stress te induceren en de onderliggende mechanismes te onderzoeken. Deze experimenten kunnen belangrijke nieuwe inzichten geven in de seksespecifieke gevoeligheid voor de negatieve effecten van prenatale stress en bijdrage aan het begrijpen van het overschot aan mannen in veel neuro-ontwikkelingsaandoeningen.

Referenties:

Kinney et al. Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci Biobehav Rev* (2008) 32:1519-1532

Attladotir et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* (2010) 40:1423-1430

Schroeder et al. Prenatal stress effects on emotion regulation differ by genotype and sex in prepubertal rats. *Dev. Psychobiol.* (2013) 55:176-92

Xuan and Hampson. Gender-Dependent Effects of Maternal Immune Activation on the Behavior of Mouse Offspring. *PLOS One* (2014) 9: e104433

Kinney et al. Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci. and Biobehav. Rev.* (2008) 32:1519-1532

Miles & Hillman. Value of a clinical morphology examination in autism. *Am. J Med. Genet.* (2000) 91: 245-53

Schaafsma & Pfaff. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Front Neuroendocrinol.* (2014) 35: 255-271

Hallmayer et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. (2011) *Arch. Gen Psychiatry* 68: 1095-1102

Schwarz and Bilbo. Sex, glia, and development: Interactions in health and disease *Horm Behav.* (2012) 62:243-53

Lenz et al. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior *J. Neurosci.* (2013) 33: 2761-72

Amateau & McCarthy. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nature Neurosci* (2004) 7: 643-650

Zhao et al. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats. *Neurobiology of Disease* (2014) 68: 57-65

Gregg et al. Gene expression changes in children with autism. *Genomics* (2008) 91, 22-29 (2008)

Hsiao et al. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation *PNAS* (2012) 109: 12776-12781

Zhan et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neurosci* (2014) 17:400-406

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De algemene doelstelling is om aan te tonen of de seksespecifieke kwetsbaarheid voor prenatale stress op hersenen en gedrag veroorzaakt wordt [REDACTED]

Het project is realistisch en haalbaar aangezien de materialen en technieken die nodig zijn voor de uitvoer van het project voorhanden zijn in de twee labs die direct betrokken zijn bij dit voorstel. Er is voldoende ervaring met de technieken om de uitvoer van het project soepel te laten verlopen.

Bv gedragstechnieken: van Hasselt et al. Within-litter variation in maternal care received by individual pups correlates with adolescent social play behavior in male rats. *Physiol & Behav* (2012) 106:701-706 (Joels lab)

van Hasselt et al. Individual Variations in Maternal Care Early in Life Correlate with Later Life Decision-Making and c-Fos Expression in Prefrontal Subregions of Rats (2012) *PLOS ONE* 7:e37820

Bv intracerebroventriculaire injecties: DEC number 2013.I.11.084 (Joels lab)

Bv moleculaire technieken op microgliacellen: Orre et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol of aging* (2014) 35:2746-2760 (Hol lab)

Bv electrophysiologische technieken: Sarabdjitsingh and Joels. Rapid corticosteroid actions on synaptic plasticity in the mouse basolateral amygdala: Relevance of recent stress history and beta-adrenergic signaling (2014) 112:168-175

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Dit onderzoek is fundamenteel van aard; de opbrengsten behelzen voornamelijk wetenschappelijke kennis en inzicht. Wij onderzoeken hoe een omgevingsfactor negatieve effecten kan hebben op 1 van de 2 seksen. Deze inzichten kunnen ook belangrijk blijken voor het veld dat zich bezig houdt met hersenstoornissen met een duidelijke seksespecifieke incidentie zoals autisme spectrum stoornissen waarbij voor elk meisje ten minst 4 jongens worden gediagnosticeerd. Door zijn fundamentele aard zal het onderzoek niet direct leiden tot nieuwe medicijnen voor autisme spectrum stoornissen of andere hersenaandoeningen, maar door nieuwe inzichten te verschaffen, kan het wel aanknopingspunten bieden voor vervolgonderzoek naar geschikte medicijnen.

Lang werden defecte genen aangewezen als primaire boosdoener van autisme spectrum stoornissen en andere hersenstoornissen, maar het wordt steeds duidelijker dat de omgeving ook een cruciale rol speelt. De omgeving in de baarmoeder is daarbij erg belangrijk. Prenatale stress blijkt de kansen op autisme bijvoorbeeld te vergroten. Als wij aantonen hoe het kan dat prenatale stress vooral voor jongetjes nadelig uitpakt, hebben wij een potentieel belangrijk

mechanisme blootgelegd dat zou kunnen verklaren hoe (een deel van) het sekseverschil in autisme incidentie ontstaat. Vervolgonderzoek zou zich dan op deze vraag moeten toespitsen.

Dit onderzoek kan ook leiden tot vervolgonderzoek dat betere identificatie van risicogroepen teweeg brengt (bijvoorbeeld jongetjes van moeders die tijdens de vroege zwangerschap zijn opgenomen in het ziekenhuis, hoge koorts hebben gehad, of veel stress hebben ondervonden - dit zijn risicofactoren die op dit moment nog niet worden gebruikt bij identificatie van risicogroepen). Betere identificatie van risicogroepen kan leiden tot vroegere interventies. Het is wetenschappelijk aangetoond dat verlaging van de interventieleeftijd, de kwaliteit van leven en productiviteit van mensen met autisme sterk vergroot.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Fase 1

Als eerste zullen we testen of prenatale stress leidt tot [redacted] en of dit stabiel is tijdens de ontwikkeling. De prenatale stress zal geïnduceerd worden vroeg in de zwangerschap aangezien dit de periode is dat prenatale stress de sterkste seksespecifieke effecten heeft (Mueller en Bale, 2007). Alleen milde stress zal gebruikt worden aangezien vroege prenatale stress al snel leidt tot reabsorptie/abortus van de pups. De toegepaste stress wordt gebaseerd op voorgaande onderzoeken en op eigen resultaten die laten zien dat de gekozen stress methoden niet leiden tot reabsorptie/abortus van de pups en ook niet de innesteling van de vrucht voorkomt. Immunologische stress zal worden geïnduceerd door middel van een intraperitoneale injectie met een stof die het immuunsysteem activeert zonder dat de moeder daadwerkelijk een ziekte krijgt. Een voorbeeld is lipopolysaccharide (LPS) – een molecuul dat voorkomt op het membraan van bacteriën en een immunreactie veroorzaakt in zoogdieren.

De pups worden ingedeeld in de volgende groepen (2 per groep om litter effecten te minimaliseren (totaal dus maximaal 8 per nestje); eventuele overgebleven dieren worden gedood): Mannetjes controle, vrouwtjes controle, vrouwtjes [redacted]

[redacted] De helft van de dieren zal worden blootgesteld aan vroege prenatale stress (bv LPS), de andere helft aan een controle substantie.

Dierexperimenten hebben aangetoond dat vroege prenatale stress leidt tot [redacted]. In de werkhypothese wordt dit beschouwd als een eerste, niet seksespecifieke hit [redacted]. Om te onderzoeken of prenatale stress leidt tot [redacted] zullen we de hersenen bekijken van de dieren in de verschillende groepen. We hebben 3 tijdstippen gekozen die wetenschappelijk cruciaal zijn in de ontwikkeling [redacted]: PND4 – dit valt samen met het punt van sterkste verschillen [redacted] tussen de seksen. PND21 – wanneer in de normale ontwikkeling [redacted] meer te zien is en er geen sekseverschil [redacted] meer is. PD80 – het volwassen dier. De dieren zullen 1 uur voor doding een intraperitoneale injectie krijgen met BrdU wat ons in staat stelt om de mitotische staat [redacted] te bekijken. Door middel van kleuringen van de uitgerepareerde hersenen kunnen we [redacted] zien in verschillende relevante hersengebieden waaronder de [redacted]. Binnen de prenataal gestreste dieren verwachten we de sterkste/langdurigste microglia overactivatie in de controle mannetjes (positieve controle) en [redacted]; de minste [redacted] in de controle vrouwtjes (negatieve controle) en de [redacted].

Vervolgens zullen we testen of de resultaten gegeneraliseerd kunnen worden naar een bredere oorsprong van prenatale stress. Naast de acute, fysieke stress veroorzaker, zoals bv. LPS zoals hierboven beschreven, zullen we ook een hele andere stress veroorzaker gebruiken, namelijk een die meer chronisch van aard is en bovendien een meer psychologisch karakter heeft, namelijk chronische variabele stress. Ook deze methode is een vaak gebruikte methode

om stress te veroorzaken (Katz et al., 1981) en leidt, net als een infectie, tot activatie van het immuunsysteem (Bronson and Bale, 2014). Het zwangere vrouwtje zal in het begin van de zwangerschap 7 dagen lang blootgesteld worden aan een andere vorm van lichte psychologische stress zoals 36 uur licht periode, 1 uur vossengeur, nieuwe objecten in de kooi tijdens de actieve periode (donker), 5 minuten 'restrained stress', white noise (random geluidssignaal) voor de gehele actieve periode, meerdere verschoningen van de kooi in de licht periode, en verzadigd beddingmateriaal met 23 °C water in de actieve periode (Mueller and Bale, 2006, 2007). Deze methoden leveren geen pijn op voor de muis.

De groep dieren die zal worden gebruikt voor [REDACTED] op PND80 (boven) zal eerst, op PND60, worden getest op gedrag. Testen die gebruikt zullen worden zijn allen uitbundig beschreven in de literatuur en relevant op het gebied van neuro-ontwikkelingsstoornissen. Het gedrag dat tot uiting komt in de testen wordt gereguleerd door specifieke en voor ons onderzoek relevante hersengebieden [REDACTED] aangezien deze gebieden (seksespecifiek) veranderen na blootstelling aan prenatale stress en aangezien zij veranderde anatomie of fysiologie laten zien in patiënten met neuro-ontwikkelingsstoornissen. Dit behelst testen voor [REDACTED] Deze gedragstesten zijn niet invasief. Tussen de verschillende testen zal tenminste 3 dagen rust gepland worden.

Beslismoment: vinden we inderdaad [REDACTED] heeft op de hersenen en het gedrag na prenatale stress dan zullen we met andere experimenten doorgaan. Vinden we geen effect dan zal het project gestaakt worden.

Fase 2.

Het eerste vervolg experiment zal onderzoeken of [REDACTED] een rol speelt in de seksespecifieke gevolgen van prenatale stress. [REDACTED] Als dit proces verstoord is heeft dit veel invloed op het gedrag. Een nieuwe groep dieren, zoals hierboven beschreven, zal gebruikt worden om te onderzoeken of [REDACTED] nodig is om de [REDACTED] te veranderen na prenatale stress. Na doding van de dieren zullen de relevante hersengebieden onderzocht worden met behulp van immunohistochemische en electrofysiologische technieken. Kleuringen en electrofysiologie kunnen ons vertellen hoe het gesteld is met de [REDACTED] in de verschillende groepen.

Fase 3.

Hierna zal een groep dieren gebruikt worden om te onderzoeken of [REDACTED] veranderingen na prenatale stress blootstelling leidt tot veranderingen in het genomisch profiel van [REDACTED]. Er zal gekeken worden of eiwitten [REDACTED], dat een belangrijke rol speelt in de feed-forward loop van [REDACTED], in sterkere mate worden getranscribeerd. Maar er zal ook naar andere immuunfactoren gekeken worden om een beter beeld te krijgen van het [REDACTED] op moleculair niveau. De factoren die in verhoogde mate worden afgeschreven in de prenatale stress en [REDACTED] groepen zullen verder worden bekeken door de epigenetische status van de promotor van deze genen te bekijken. We kunnen zo onderzoeken of veranderingen in de epigenetische status van genen zoals [REDACTED] wellicht de reden is waarom [REDACTED] zijn in de prenatale stress en [REDACTED] groepen. We zullen ons focussen op de [REDACTED] aangezien deze gebieden vaak atypisch zijn in neuro-ontwikkelingsstoornissen en de gemeten gedragingen (zie boven) controleren.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Alle onderdelen worden uitgevoerd met een prenataal stress model voor muizen

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De proeven worden in 3 fases uitgevoerd.

De experimenten in Fase 1 dienen om te onderzoeken of [REDACTED] genoeg en noodzakelijk is om de effecten van prenatale stress te zien op de [REDACTED] en gedrag. In deze fase wordt een groep gedood op PND 4, 21, en 80 voor immunohistochemische technieken. De laatste groep (PND80) wordt eerst ook gebruikt op PND60 om de [REDACTED] effecten van prenatale stress te testen op gedrag.

De experimenten in Fase 2 dienen om te onderzoeken of [REDACTED] effecten van prenatale stress veranderingen in [REDACTED] veroorzaakt aangezien dit een mechanisme kan zijn dat de gedragsveranderingen kan verklaren. De dieren in deze fase zullen gedood worden om immunohistochemische en electrofysiologische technieken mogelijk te maken.

De laatste fase, fase 3, dient om te bekijken of de [REDACTED] van PS veroorzaakt worden door epigenetische veranderingen in de [REDACTED] in relevante hersengebieden.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

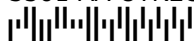
Volqnummer	Type dierproef
1	Model om de gevolgen van prenatale stress in het brein van de muis te onderzoeken.
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015113

Bijlagen

2

Datum 22-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 mei 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015113. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2015
Geplande einddatum: 30 mei 2020
Titel project: Immune System Involvement in Sex-Specific Vulnerability to Prenatal Stress
Titel niet-technische samenvatting: Stress of ziekte tijdens de zwangerschap: waarom is dat erger voor zoontjes dan voor do
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl


Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: utrecht
Datum: 13 mei 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015113

Bijlagen

2

Datum 22-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 22 mei 2015

Vervaldatum: 21 juni 2015

Factuurnummer: 201570113

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015113	€ 741,00

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.I.527.007
2. Titel van het project : Immune System Involvement in Sex-Specific Vulnerability to Prenatal Stress
3. Titel van de NTS : Stress of ziekte tijdens de zwangerschap: waarom is dat erger voor zontjes dan voor dochtertjes?

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – [REDACTED]
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 30-03-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 08-04-2015
 anderszins behandeld: per emailronde: 22-04-2015 en 30-04-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-04-2015 tot 21-04-2015 en 30-04-2015
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 08-05-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 14-04-2015 en 30-04-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

Met betrekking tot de NTS heeft de DEC onderzoeker op 14-04-2015 de volgende vragen gesteld:

- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u in de eerste alinea de zinsnede 'jongetjes of meisjes' te vervangen door 'mannelijke of vrouwelijke nakomelingen', omdat het hier nog gaat over dierexperimenteel onderzoek. Graag aanpassen.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u de eerste zin van de derde alinea wat uitgebreider toe te lichten.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u de laatste zin van de derde alinea wat genuanceerder te verwoorden. U schrijft nu stellig over 'hoe autisme veroorzaakt zou kunnen worden', terwijl u naar de mening van de DEC hooguit een correlatie kunt vaststellen. Graag aanpassen. Dit geldt ook voor punt 3.3 van het projectvoorstel.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u het stukje over kosten weg te laten, dit is niet relevant voor fundamenteel onderzoek. Dit geldt tevens voor punt 3.3 van het projectvoorstel.
- 3.2 Opbangsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC verzoekt u dit stuk wat terughoudender te schrijven. Zoals het er nu staat kunnen er verwachtingen gewekt worden bij de lezer die niet waargemaakt kunnen worden. Graag aanpassen.

Met betrekking tot het projectvoorstel heeft de DEC onderzoeker op 14-04-2015 de volgende vragen gesteld:

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u in de achtergrond eerst een wat breder beeld te schetsen van het onderzoeksveld. Er is een grote verscheidenheid aan literatuur over factoren die bij zouden kunnen dragen aan het ontstaan van autisme. Prenatale stress is er daar slechts één van. Door te laten zien dat u zich dat realiseert en vervolgens uw keuze voor juist deze factor als focus van uw onderzoek nader te onderbouwen, wordt het geheel sterker. Graag aanpassen.
- 3.1, achtergrond: U noemt in de tweede alinea dat er aanwijzingen zijn gevonden dat [REDACTED] een cruciale rol spelen in de sekse specifieke kwetsbaarheid voor prenatale stress. Dit is een zeer belangrijke bevinding voor de rechtvaardiging van uw onderzoek. De DEC verzoekt u dit te onderbouwen met een literatuurverwijzing.
- 3.1, achtergrond: het eind van pagina 2 is sprake van preventie en van identificatie van risicogroepen. De commissie lijkt dit een veel te voorbarige verwijzing naar mogelijk toepassingen van de resultaten. De DEC verzoekt u dit veel beter te onderbouwen of dat anders weg te laten. Gezien het feit dat het gaat om fundamenteel onderzoek, kan de DEC ook leven met de laatste optie.
- 3.2, doel: De DEC denkt dat het beter is om in de tweede regel te spreken over sekse-specifieke "overactivatie" in plaats van activatie. Graag aanpassen.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC vermoedt dat toediening van LPS bedoeld is als positieve controle, om verminderde [REDACTED] aan te kunnen tonen. Zo niet, dan verzoekt de

DEC u toe te lichten waarom u desalniettemin meent dat fase 1 van het onderzoek nodig is, omdat dit dan geen extra informatie toevoegt.

- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u de strategie wat minder gedetailleerd weer te geven. De 2e alinea is pas te begrijpen na bestudering van de betreffende dierproef. Deze mate van detail is hier niet op zijn plaats. Graag aanpassen.

Bijlage 1:

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Uw onderzoek berust voor een belangrijk deel op de waarnemingen van Kinney et al, 2008 die waarnam bij een grote groep vrouwen dat stress in het eerste en tweede trimester van de zwangerschap aanleiding zou kunnen geven tot autisme bij het kind. Stress in het derde trimester gaf geen significante uitkomst. U tracht overactivatie bij mannelijke foeten ██████████ te correleren aan geslachtsdifferentiatie van de hersenen, ██████████ en mogelijk autisme. Processen die zich afspelen in het eerste deel van de zwangerschap. Desondanks induceert of remt u ██████████ post nataal. Bij het ontwerpen van de proef bent u er dus kennelijk van uit gegaan dat de ██████████ nog aanwezig is (en effecten heeft) na de geboorte. Ook lijkt u te veronderstellen dat de effecten van ██████████ (gedeeltelijk) reversibel zijn. Graag toelichten. Wat zijn hiervoor de aanwijzingen?
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of het risico dat er geen innesteling (of abortus) plaatsvindt door teveel stress van de moeder tijdens de zwangerschap is meegewogen bij het selecteren van de stressoren. Graag toelichten.
- K. Classificatie van ongerief: De toegediende stressoren beogen chronisch stress na te bootsen. De gevolgen daarvan voor de pups zijn aanzienlijk. Waarom gaat u er dan toch van uit dat dit alles slechts licht ongerief veroorzaakt? De DEC vraagt zich af of het ongerief niet zou moeten worden ingeschat als matig. Graag uw visie en eventueel aanpassen.
- Op 30-04-2015 heeft de DEC de onderzoeker nog gevraagd een aantal typefouten en onduidelijke zinnen te verbeteren.

- Datum antwoord: 21-04-2015 en 30-04-2015

- Strekking van het (de) antwoord(en):

Antwoorden m.b.t. de NTS op 21-04-2015:

- De onderzoeker heeft de opmerkingen en suggesties van de DEC verwerkt in de NTS en deze herschreven.

Antwoorden m.b.t. het projectvoorstel op 21-4-2015:

- 3.1, achtergrond: Dit stuk is aangepast en er worden meer factoren genoemd die betrokken zijn bij de etiologie van autisme. Tegelijkertijd wordt hier geprobeerd te voorkomen dat het voorstel een 'autisme voorstel' wordt. Dit onderzoek wil een mechanisme bloot leggen dat kan verklaren waarom mannen meer last hebben van vroege prenatale stress. Er wordt niet

direct onderzoek gedaan naar autisme. 3.1 Geeft nu een breder beeld van het veld en de onderzochte hypothese wordt beter ingeleid.

- 3.1, achtergrond: Dit berust op een miscommunicatie. De aanwijzingen (die in de tekst worden beschreven en waarvan de bijbehorende artikelen worden genoemd) zorgen ervoor dat we dit nu gaan onderzoeken. De 'aanwijzing' was dat [REDACTED] [REDACTED] maar ook door prenatale stress. De kans dat [REDACTED] [REDACTED] prenatale stress is groter [REDACTED] niet alleen door de prenatale stress geactiveerd worden, [REDACTED] [REDACTED]). De tekst is nu zo herschreven dat er geen mogelijkheid meer is op verwarring: de alinea begint nu zonder de mogelijkheid op verwarring: "Dit onderzoek test onze hypothese dat [REDACTED] [REDACTED] een cruciale rol spelen in de seksespecifieke kwetsbaarheid voor prenatale stress".
- 3.4, onderzoeksstrategie: LPS wordt gebruikt om prenatale stress te veroorzaken. Er is een zin toegevoegd die nog eens benadrukt dat de helft van de dieren wordt blootgesteld aan prenatale stress (bv LPS). Wij verwachten inderdaad dat LPS in dieren die ook worden blootgesteld [REDACTED] [REDACTED] laten zien, en is dus inderdaad een positieve controle. De volgende zin is toegevoegd zodat duidelijker is welke groep onze positieve en negatieve controle is: "Binnen de prenataal gestreste dieren verwachten we de sterkste/langdurigste [REDACTED] controle mannetjes (positieve controle) [REDACTED] [REDACTED]; de minste [REDACTED] [REDACTED]."
- Tekstuele op- en aanmerkingen van de DEC zijn verwerkt in het projectvoorstel.

Bijlage 1:

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het klopt dat de verwachting is dat de effecten van vroege prenatale stress beïnvloed kunnen worden door neonatale interventie. Het is inderdaad zo dat stress vroeg in de prenatale ontwikkeling leidt tot

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]. Tot slot ontwikkelt een autisme spectrum disorder zich ook niet voor de geboorte; de eerste diagnoses worden gesteld rond 6 maanden na de geboorte, maar de meeste professionals maken pas 18 maanden na de geboorte de uiteindelijke diagnose op. 18 Maanden is de leeftijd waarop een ASD als stabiel wordt beschouwd (Autism Speaks). In zowel de bijlage als het projectvoorstel (3.1) wordt nu beter uitgelegd hoe het kan dat, zoals hierboven uitgelegd, manipulaties na de geboorte invloed kunnen hebben op de uitkomst van een factor die ruim voor de geboorte plaatsvindt.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Hier is rekening mee gehouden. Eigen data (ongepubliceerd) en voorgaand onderzoek (bv. Coyle et al 2009) hebben laten zien dat de gekozen prenatale stress methoden niet leiden tot reabsorptie/abortus van de pups of dat het innesteling voorkomt. Dit staat nu ook expliciet vermeld in de bijlage. In het projectvoorstel was dit reeds vermeld.
 - K. Classificatie van ongerief: De chronische variabele stress (CVS) paradigma geeft inderdaad chronische stress aan de moeders, maar de stress is van lichte aard, is niet invasief/niet pijnlijk en heeft niet direct invloed op voedselinname van de moeder en het lichaamsgewicht (Mueller en Bale, 2006 Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. Physiology & Behavior 88:605-614). Als de moeder, zoals in dit experiment, vroeg in de zwangerschap wordt blootgesteld aan milde CVS heeft dit bijvoorbeeld ook geen invloed op het gewicht van de jongen (Mueller en Bale, 2006). Al hoewel er inderdaad effecten van CVS op de pups zijn, bijvoorbeeld op gedragsniveau, zijn er in de literatuur geen aanwijzingen dat de CVS pups ongerief ervaren. Kijkend naar Richtlijn 2010/63/EU van het Europees parlement en de Raad betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt, Bijlage VIII, past het verwachte ongerief beter in de klasse 'Licht'. Er wordt niet verwacht dat de pups na de geboorte 'een matige vorm van pijn, lijden of angst, dan wel langdurig een lichte vorm van pijn, lijden of angst zullen ondervinden' (deel 1 definitie matig ongerief) door de prenatale stress. Ook wordt niet verwacht dat de prenatale stress procedure na de geboorte leidt tot 'een matige hinder voor het welzijn of de algemene toestand van de dieren' (deel 2 definitie matig ongerief). Het ongerief van de dieren valt om die reden beter binnen de categorie 'licht'.
 - N.a.v. de opmerkingen van de DEC d.d. 30-04-2015 heeft de onderzoeker typfouten verbeterd en onduidelijke zinnen verhelderd.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
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. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
 - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
 - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het vergroten van kennis over seksespecifieke kwetsbaarheid van mannelijke nakomelingen voor aandoeningen, zoals autisme spectrum stoornissen, als de moeder ziekte of stress ervaart tijdens de vroege zwangerschap. Deze studie zal niet direct leiden tot een behandeling voor autisme en andere hersenaandoeningen, maar door het mechanisme te ontrafelen, kan het aanknopingspunten bieden voor vervolgonderzoek naar preventie en behandeling.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. 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)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht. In eerste instantie had de DEC enige twijfel over de juistheid van deze inschatting en heeft de onderzoeker gevraagd of het ongerief niet zou moeten worden ingeschat als matig vanwege het toebrengen van chronische stress (zie punt A8, vragen DEC d.d. 21-04-2015, laatste vraag). Na het uitgebreide en met literatuur onderbouwde antwoord van de onderzoeker is de DEC ervan overtuigd dat licht inderdaad een realistische inschatting is van het ongerief. Daarnaast krijgen de moeders eenmalig een injectie van een irriterende substantie toegediend. De vrouwelijke pups worden onder anesthesie bilateraal intracerebroventriculair geïnjecteerd en de mannelijke pups krijgen een subcutane injectie met ██████████ dan wel saline toegediend. Met een deel van de pups worden nog gedragsexperimenten gedaan om ze te testen op sociale en cognitieve vaardigheden. Ook deze handelingen veroorzaken naar het oordeel van de DEC niet meer dan licht ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit onderzoek wordt bestudeerd hoe ██████████ een rol spelen in de effecten van vroege prenatale stress, een puur biologisch fenomeen dat niet door robotica of anderszins vervangen kan worden. Bovendien vindt dit onderzoek plaats gedurende de ontwikkeling van het individu. Het doorlopen van dat ontwikkelingsproces is essentieel voor de beantwoording van de vraagstelling. De onderzochte processen zijn afhankelijk van een complex samenspel van biologische factoren waaronder epigenetische veranderingen en het stress systeem; deze kunnen niet betrouwbaar ex vivo of in vitro gemodelleerd worden. Een belangrijke uitleesparameter is onder andere complex gedrag. Om die reden is dit onderzoek ook niet in vitro uit te voeren. Ook is het niet mogelijk deze studie in mensen uit te voeren, omdat de effecten van de manipulaties op de hersencellen (en de mechanismen daarachter) bestudeerd worden.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. De onderzoekers zorgen ervoor dat stressvolle momenten, buiten de daadwerkelijk manipulatie, zo veel mogelijk geminimaliseerd worden. In het lab is veel expertise aanwezig, waardoor de kans dat er iets misgaat of dat weefsel niet gebruikt kan worden gering is. De injectie van de pups vindt onder narcose plaats en alle dieren worden regelmatig gemonitord.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk onderzoeken of de seksespecifieke kwetsbaarheid voor prenatale stress op hersenen en gedrag veroorzaakt wordt door [REDACTED], substantieel is en opweegt tegen het lichte ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

Er wordt weliswaar chronische stress toegediend bij de moeders, maar de individuele stressoren zijn naar verhouding licht van aard. De DEC is dan ook van mening dat gekozen is voor de juiste onderzoeksstrategie en dat deze handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar. Dit onderzoek is in deze fase vooral fundamenteel van aard. De vraag of de resultaten vertaalbaar zullen zijn naar de mens is op dit moment nog niet goed te beantwoorden. Wel kan dit onderzoek bijdragen aan het vergroten van kennis over seksespecifieke kwetsbaarheid van mannelijke nakomelingen voor bepaalde aandoeningen, zoals autisme spectrum stoornissen, als gevolg van prenatale stress bij de moeder. Die kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan preventie en ontwikkeling van therapieën voor die aandoeningen. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is.
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren.
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist.

- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Model om de gevolgen van prenatale stress in het brein van de muis te onderzoeken.</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Model om de gevolgen van prenatale stress in het brein van de muis te onderzoeken.
Volgnummer	Type dierproef				
1	Model om de gevolgen van prenatale stress in het brein van de muis te onderzoeken.				

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Wij hebben gekozen voor een diermodel aangezien we de complexe gevolgen van prenatale stress willen onderzoeken op moleculair, cel en gedragsniveau. Dit muismodel (C57BL/6) zal worden gebruikt omdat dit muistype het meest gebruikt wordt als model voor menselijke aandoeningen, zeker als gedrag een belangrijke rol speelt in het onderzoek. Ook voor neuro-ontwikkelingsstoornissen wordt dit model het vaakst gebruikt. De resultaten gebruik makend van dit diermodel zullen dus het beste aansluiten bij voorgaand en toekomstig onderzoek. Dit muismodel fokt eenvoudig en de nesten zijn relatief groot (groter dan bv. het BALB/c muis model) zodat minder moeders gebruikt hoeven te worden.

Dit onderzoek zal kunnen uitwijzen hoe het kan dat mannetjes kwetsbaarder zijn voor vroege prenatale stress dan vrouwtjes. Deze vroege prenatale stress, waarvan eigen data en voorgaand onderzoek heeft laten zien dat het niet leidt tot reabsorptie/abortus van de pups of innesteling voorkomt, kan gezien worden als een eerste, niet seksspecifieke, hit op [REDACTED]. Het is eerder aangetoond dat vroege prenatale stress in knaagdieren leidt tot langdurige [REDACTED]

[REDACTED] en wordt in deze studie aangewezen als een mogelijke tweede, seksspecifieke, hit die er voor zou kunnen zorgen dat [REDACTED] wat schadelijke gevolgen kan hebben.

Het is deze potentieel cruciale seksspecifieke rol voor [REDACTED] die in deze studie wordt onderzocht. Om dit te bewijzen is het noodzakelijk om een tweeledige aanpak te gebruiken: enerzijds krijgen dieren die normaliter niet blootgesteld worden aan [REDACTED] (dit nu in de experimenten wel [REDACTED] om de typische mannelijke gevoeligheid voor prenatale stress ten toon te spreiden?), anderzijds worden dieren die normaliter wel blootgesteld worden aan [REDACTED] dat dit keer niet [REDACTED] voldoende om de kwetsbaarheid te niet te doen?).

In deze dieren worden verschillende uitkomstparameters gemeten:

1. Mate van [REDACTED] tijdens de ontwikkeling
2. [REDACTED] tijdens de ontwikkeling [REDACTED]
3. Verschillende gedragsparameters zoals [REDACTED].
4. Status van [REDACTED]. Deze hersengebieden zijn relevant omdat ze atypisch zijn in veel patiënten met neuro-ontwikkelingsstoornissen, ze seksspecifiek reageren op prenatale stress en op gedragingen die door deze gebieden worden aangestuurd.
5. Status van epigenetische markers in dezelfde relevante hersengebieden.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Zwangere moeders:

Eenmalige injectie van een irriterende substantie zoals lipopolysaccharide (of controle substantie) in het begin van de zwangerschap zonder dat dit mortaliteit van de jongen veroorzaakt. Om de effecten van prenatale stress te kunnen generaliseren is het nodig om een andere aanpak mee te nemen (in een andere groep zwangere vrouwen): het chronische variabele stress paradigma. Hierbij wordt door de dieren ongemak, maar geen pijn ervaren. In de eerste periode van de zwangerschap wordt de zwangere vrouw blootgesteld aan 1 van 7 methoden (elke dag een andere, totaal aantal dagen:7) en kan inhouden: 36 uur licht periode, 1 uur vossengeur, nieuwe objecten in de kooi tijdens de actieve periode (donker), 5 minuten 'restrained stress', luid random geluid/ruis ("white noise") tijdens de gehele actieve periode, meerdere verschoningen van de kooi in de licht periode, en verzadigd beddingmateriaal met 23 °C water in de actieve periode (Mueller and Bale, 2006, 2007).

Pups:

De pups worden ingedeeld in de volgende groepen (2 per groep (dus maximaal 8 per nest); eventuele overgebleven dieren worden gedood): Mannetjes controle ([REDACTED]), vrouwtjes controle ([REDACTED]), mannetjes ([REDACTED]), vrouwtjes ([REDACTED]). Onder anesthesie worden de pups bilateraal intracerebroventriculair geïnjecteerd ([REDACTED]) of met PBS als controle (de 3 andere groepen). Deze dosis [REDACTED] is uitgebreid getest en bewezen voldoende te zijn om een [REDACTED]

De groepen dieren op PND4, 21, 60, 80 worden gedood voor immunohistochemische technieken, electrophysiologische technieken en epigenetische

technieken.

De groepen dieren op PND60 worden gebruikt voor gedragsexperimenten. Muizen worden getest op sociale en cognitieve vaardigheden. Tussen testen zal altijd ten minste 3 dagen zitten.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

De muizen die gebruikt worden op PND60 in de gedragstesten worden hergebruikt. Deze dieren worden gedood op PND80 zodat zij gebruikt kunnen worden voor de electrofysiologische en immunohistochemische experimenten. Hierdoor wordt het aantal dieren tot een minimum beperkt. Ook worden er poweranalyses gedaan om te zorgen dat de groepen groot genoeg zijn om significante verschillen aan te kunnen tonen, maar wel het minimale aantal daarvoor te gebruiken.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

De gebruikte diersoort is *Mus musculus*. Volwassen mannen en vrouwen zullen worden aangekocht van een gecertificeerd bedrijf.

De uitleesparameters worden genomen van de jongen.

ANOVAs worden gebruikt om de main effecten en interacties van prenatale stress, [REDACTED] en sekse te onderzoeken. Met een post-hoc benadering bekijken we afzonderlijke effecten.

Poweranalyses laten zien dat we met een medium effect size ($f=0.4-0.35$) 11 tot 14 muizen per groep nodig hebben per experiment, $\alpha=0.05$, $\text{power}=0.95$, $\text{numerator df}=1$ en aantal groepen = 8 (prenatal stress (2) x sekse (2) x microglia activatie (2)). Uit onze ervaring blijkt ook dat voor de verschillende parameters 10-15 dieren per groep over het algemeen voldoende is.

Het project bestaat uit 10 deelexperimenten

Fase 1

1. [REDACTED] en prenatale stress door middel van een ontstekingsinducerende stof [REDACTED] op PND4
2. [REDACTED] en prenatale stress door middel van een ontstekingsinducerende stof [REDACTED] op PND21
3. [REDACTED] en prenatale stress door middel van chronische variabele stress op [REDACTED] op PND4
4. [REDACTED] en prenatale stress door middel van chronische variabele stress op [REDACTED] op PND21
5. [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten) op sociaal gedrag en [REDACTED] op PND60
6. [REDACTED] en prenatale stress door middel van een ontstekingsinducerende stof [REDACTED] op PND80
7. [REDACTED] en prenatale stress door middel van chronische variabele stress op [REDACTED] op PND80

Fase 2

8. [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten) op [REDACTED] op PD60 - gemeten door middel van immunohistochemische technieken
9. [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten) op [REDACTED] op PD60 - gemeten door middel van electrofysiologische technieken

Fase 3

10. [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten) op genexpressie en epigenetische status van relevante promotors op PND60

In totaal hebben we dus nodig:

120 dieren maximaal per experiment en we hebben 10 experimenten = 1200.

20 moeders per experiment maximaal (maximaal 15 als elke moeder precies van ten minste 4 mannelijke en 4 vrouwelijk pups bevalt) en we hebben 10 experimenten = 200

Als we voor de zekerheid incalculeren dat 1% van de dieren uitvalt hebben we nog 14 extra dieren nodig.

Totaal maximaal aantal dieren aangevraagd voor 5 jaar (1200+200+14): 1414

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: er is geen vervanging voor deze dierproeven beschikbaar. We bestuderen hoe een rol spelen in de effecten van vroege prenatale stress, een puur biologisch fenomeen dat niet door bv robotica of anderszins vervangen kan worden. We doen dit bovendien door de ontwikkeling van het individu heen. De onderzochte processen zijn afhankelijk van een complex samenspel van biologische factoren waaronder epigenetische veranderingen en het stress systeem; deze kunnen niet naar betrouwbaarheid gemodelleerd worden. Een belangrijke uitleesparameter is onder andere complex gedrag. Dit onderzoek is om deze redenen ook niet in vitro uit te voeren.

Aangezien we mechanismen bestuderen en het effect van onze manipulaties willen zien op de hersencellen is het ook niet mogelijk onze studies in mensen te doen.

Vermindering: door het hergebruiken van de dieren die getest worden op gedrag wordt het aantal dieren verminderd. Ook zal het hersenmateriaal optimaal gebruikt worden. Een voorbeeld is het gebruik van de ene hersenhelft voor genexpressie en het andere voor epigenetische technieken. Om effecten van lateralisatie tegen te gaan zal de linker of rechter hersenhelft random worden ingedeeld.

Ook is het belangrijk om te onderzoeken of verschillende vormen van prenatale stress leiden tot dezelfde uitkomsten in gedrag en veranderingen in de hersenen. We zullen de experimenten eerst uitvoeren gebruik makend van beide stress methodes. We kiezen vervolgens alleen de stress methode waar we daadwerkelijk duidelijke verschillen zien tussen de experimentele groepen en de controle groepen. Hierbij reduceren we de aantallen proefdieren sterk.

Verfijning: Aangezien we de effecten van stress testen kunnen we niet de stress voor het dier weghalen. Wel zorgen we dat stressvolle momenten buiten de daadwerkelijk manipulatie zo veel mogelijk geminimaliseerd worden. Ook zullen we de dieren zo efficiënt mogelijk gebruiken. De gebruikte technieken zijn in het lab al geoptimaliseerd, er is dus weinig kans dat er iets misgaat of dat weefsel niet gebruikt kan worden. De labs hebben erg veel expertise op dit

onderzoeksgebied.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De injectie van de moeders wordt uitgevoerd drie dagen na het verschonen van de kooi zodat ze terugkeert naar een vertrouwde geur. Hetzelfde geldt voor dieren die terugkeren na de gedragstesten, die ook niet invasief zijn.

De injectie van de pups vindt plaats onder anesthesie om pijn en ongemak zoveel mogelijk te voorkomen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

nvt.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Bij de moeders wordt geen pijn of stress verlichtingsmethoden toegepast aangezien dit deel is van de essentie van de proef zelf (stress). Bij de pups wordt wel pijnbestrijding toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Aangezien nieuwe omgevingen voor muizen stressvol kunnen zijn kan het zijn dat de gedragsassays stress opleveren.
- 2) Ook zal het chronisch variabele stress methode stress opleveren 7 dagen achter elkaar. De dieren zullen echter geen pijn ervaren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- 1) Omdat de dieren uit hun vertrouwde kooi worden gehaald.
- 2) Omdat actief stress bij de dieren wordt veroorzaakt

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Tijdens het verschonen worden de muizen gehanteerd om ze te laten wennen aan aanraking van mensen. Na de test of manipulatie zal de muis terugkeren naar de oude kooi (niet net verschoonde bedding) aangezien dit zal helpen met het verminderen van de stress.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Alle dieren zullen systematisch gemonitord worden op lichaamsgewicht; wekelijks bij alle dieren waarvan op dat moment geen reden is om te denken dat ze ongerief hebben. Bij een lichaamsgewichtdaling van 10% ten opzichte van de voorgaande week bij volwassen dieren wordt overgegaan op doding; dit wordt niet verwacht. De moeders die geïnjecteerd zijn, worden dagelijks gewogen voor een periode van 1 week. Als zij meer dan 10% lichaamsgewicht verliezen (relatief aan de dag van injectie) wordt overgegaan op doding; dit wordt niet verwacht.

Na de intracerebroventriculaire injectie worden de pups systematisch gemonitord op gewicht, motoriek en gedrag. Bij gewichtsafname over meer dan 2 dagen of bij catatonie zal de pup gedood worden. Dit wordt niet verwacht

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<2%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

We bekijken de rol van ██████████ op de effecten van prenatale stress en de onderliggende mechanismen die zich afspelen in de hersenen. Het is daarvoor nodig om hersenmateriaal te bestuderen. Hiervoor is het noodzakelijk om het dier eerst te doden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

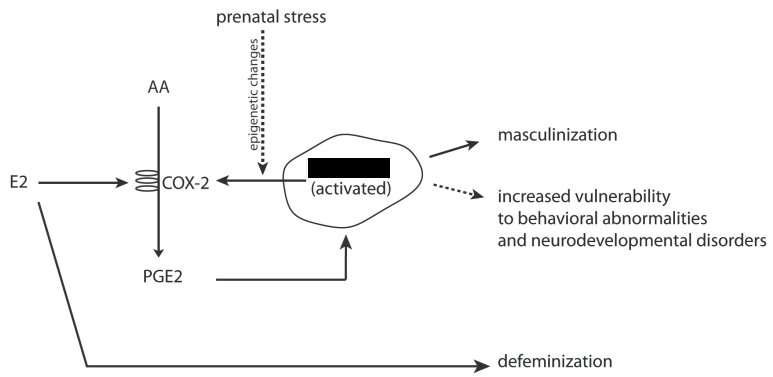


Figure 1.





Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

postadres
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69
info@ivd-utrecht.nl
www.ivd-utrecht.nl

[uw kenmerk](#)
[ons kenmerk](#)

[datum](#) 8 mei 2015
[onderwerp](#) Factuur t.b.v. leges

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA, Utrecht.

Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

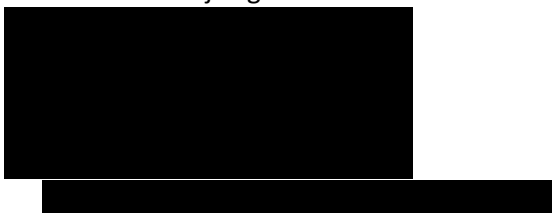
Factuuradres

UU -ASC
postbus 80.011
3508 TA Utrecht
o.v.v. **CB.841910.3.01.011**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende email adres: info.ascf@uu.nl.

Het ondertekende aanvraagformulier zal u per separate post worden toegezonden.

Met vriendelijke groet





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
3501AA Utrecht
Nederland

Centrale Commissie
Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015113

Uw referentie

Bijlagen

Datum 26 mei 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte meneer [REDACTED],

Op 18 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immune System Involvement in sex -specific vulnerability to prenatal stress" met aanvraagnummer AVD115002015113. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon, uzelf, ondertekend. U geeft aan dat er geen gemachtigde is voor het doen van een aanvraag, het aanvraag formulier is getekend met de toevoeging i.o. waardoor niet duidelijk is wie het formulier heeft ondertekend. Wilt u het aanvraag formulier voorzien van de juiste ondertekening, of een machtigingsformulier aan de CCD sturen?

Aanvullingen beschrijving Dierproeven:

Uit uw beschrijving van de experimentele aanpak worden een aantal beslismomenten met betrekking tot de fok van de dieren niet helemaal duidelijk:

1) Uw beschrijving van het aantal moederdieren die u nodig denkt te hebben om het benodigde aantal nakomelingen te hebben is gebaseerd op 8 nakomelingen per nest (4m/4f). Hoe gaat u om met nesten welke kleiner in aantal zijn of niet de juiste geslachtsverhouding hebben? Worden deze nesten in zijn geheel uitgesloten van het onderzoek of voegt u nesten samen om tot de gewenste nestgrootte te komen? Kunt u dit punt in de beschrijving dierproeven verduidelijken en op basis van uw beslismomenten het aantal moederdieren aanpassen indien nodig?

2) Kunt u verduidelijken op welk moment de intracerebroventriculair injectie wordt gegeven? Het eerste moment van opofferen wordt beschreven op PN dag 4, als de injectie op jongere leeftijd plaatsvindt wat is dan, in uw ervaring of verwachting, het risico op kannibalisme door de moeder, welke effecten heeft dit

dan op uw experimentele opzet en is dit opgenomen in de 1% uitval die u incalculeert?

3) kunt u de beschrijving van de deelexperimenten bij punt B op blz 3, verduidelijken? U beschrijft het doen van gedragstesten op PN dag 60 als een vermindering/ verfijning; dit wordt niet helder uit de huidige beschrijving, omdat dit deelexperiment hier als een aparte groep (groep 5) wordt beschreven en ook de berekening van het aantal dieren op 10 deelexperimenten is gebaseerd. Het is niet helder waar het aspect van vermindering op is gebaseerd.

4) in de beschrijving van de deelexperimenten benoemd u bij groep 5 dat het middel om prenatale stress te induceren 'nog wordt besloten'. Op basis waarvan besluit u dit in fase 1? Is dit hetzelfde middel als benoemd in fase 2 en 3?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.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.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Datum
26 mei 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015113



Melding Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



18 MEI 2015

9

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 4 4 1 9 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
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.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td>@umcutrecht.nl</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	@umcutrecht.nl
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]	@umcutrecht.nl															
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 0 1 _ 0 6 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 3 0 _ 0 5 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Immune System Involvement in Sex-Specific Vulnerability to Prenatal Stress
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Stress of ziekte tijdens de zwangerschap: waarom is dat erger voor zoontjes dan voor do
- 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 € 741,00 Lege
- Wijziging € 468,00 Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	18-05-2015
Handtekening	



18 MEI 2015

18 MEI 2015
Instantie voor
Dierenwelzijn
UtrechtCentrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGEbezoekadres 18 MEI 2015
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrechtpostadres
Postbus 12007
3501 AA UtrechtT (030) 253 15 69
info@ivd-utrecht.nl
www.ivd-utrecht.nluw kenmerk
ons kenmerkdatum 8 mei 2015
onderwerp Factuur t.b.v. leges

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA, Utrecht.

Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

FactuuradresUU -ASC
postbus 80.011
3508 TA Utrecht
o.v.v. **CB.841910.3.01.011**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende email adres: info.ascf@uu.nl.

Het ondertekende aanvraagformulier zal u per separate post worden toegezonden.

Met vriendelijke groet







> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproe
ven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
ZBO-CCD@minez.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015113

Uw referentie
-

Bijlagen
1

Datum 24 juni 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven
Geachte [REDACTED]

Op 18 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven digitaal ontvangen. Het gaat om uw project "Immune System involvement in sex-specific vulnerability to prenatal stress" met aanvraagnummer AVD115002015113. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 9 juni 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld op basis van door het secretariaat van de CCD gestelde vragen en heeft u het correct ondertekende aanvraagformulier ingezonden.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag onder voorwaarde goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Immune System involvement in sex-specific vulnerability to prenatal stress" starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 juni 2015 tot en met 30 mei 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Behalve wat betreft de ongerief inschatting voor de moederdieren met prenatale stress geïnduceerd door chronische variabele stress. Dit wordt ingeschat op matig ipv licht ongerief omdat het dier niet in staat is aan de prikkel te ontkomen en het cumulatieve effect, van 7 dagen, als matig wordt ingeschat. Dit is gebaseerd op Richtlijn 2010/63/EU bijlage VIII waarin staat: Ontkomings- en vermijdingsreacties uitlokken, waarbij het dier niet in staat is aan de prikkel te ontkomen of die te vermijden en waarbij naar verwachting matige angst wordt veroorzaakt.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

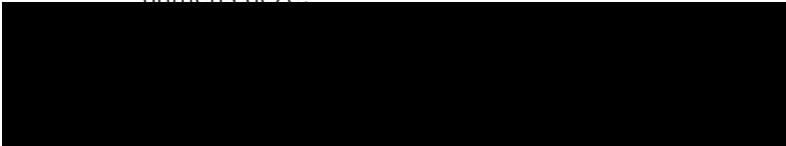
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: [REDACTED]
Postcode en woonplaats: [REDACTED] Utrecht
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 juni 2015 tot en met 30 mei 2020, voor het project "Immune System involvement in sex-specific vulnerability to prenatal stress" met aanvraagnummer AVD115002015113, volgens advies van dierexperimentencommissie DEC-Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aangepast aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 juni 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 8 mei 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 8 mei 2015;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 mei 2015, ontvangen op 8 mei 2015.
 - d. Aanvullingen ontvangen op 9 juni 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Dierproef 1: Model om de gevolgen van prenatale stress in het brein van de muis te onderzoeken	Muis moederdieren n=20 per experiment x 10 experimenten	200	Licht of Matig afhankelijk van de methode van stress inductie
	Muis nakomelingen	1200	Licht
1% uitval		14	Licht

Aanvullende voorwaarden: De ongerief bijstelling: het feitelijke aantal dieren dat matig ongerief ondergaat wordt opgenomen in de jaarlijkse NVWA rapportage.

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

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

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand. Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres

postadres

uw kenmerk
ons kenmerk

datum **9 juni 2015**
onderwerp **Antwoorden AVD115002015113**

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw brief d.d. 26 mei 2015.

Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 29 mei 2015.

Met vriendelijke groet

Amsterdam, 5 juni 2015

Geachte CCD,

In deze brief geef ik graag antwoord op uw vragen en opmerkingen over het project "Immune System Involvement in sex-specific vulnerability to prenatal stress" met aanvraagnummer AVD115002015113. De antwoorden staan dikgedrukt en in blauw onder uw oorspronkelijke vragen hieronder.

Met vriendelijke groet,

Aanvullingen beschrijving Dierproeven:

Uit uw beschrijving van de experimentele aanpak worden een aantal beslismomenten met betrekking tot de fok van de dieren niet helemaal duidelijk:

1) Uw beschrijving van het aantal moederdieren die u nodig denkt te hebben om het benodigde aantal nakomelingen te hebben is gebaseerd op 8 nakomelingen per nest (4m/4f). Hoe gaat u om met nesten welke kleiner in aantal zijn of niet de juiste geslachtsverhouding hebben? Worden deze nesten in zijn geheel uitgesloten van het onderzoek of voegt u nesten samen om tot de gewenste nestgrootte te komen? Kunt u dit punt in de beschrijving dierproeven verduidelijken en op basis van uw beslismomenten het aantal moederdieren aanpassen indien nodig?

Het absolute minimum is 15 moeders (8 experimentele groepen x 15 nesten van 8 dieren (4m/4v)) = 120 jongen. Ik heb daar 5 moeders bij opgeteld om tot een realistischer beeld te komen. 20 moeders per experiment dus. Dit aantal stond al in de aanvraag en het aantal moederdieren hoeft dus niet aangepast. In sectie B heb ik nu uitgelegd hoe dit in zijn werk gaat. De dieren worden in principe wel allemaal gebruikt en nesten worden aangepast zodat er minimaal 6 dieren en maximaal 8 dieren in een nest zitten.

De tekst in onderdeel B bevat nu het volgende:

"In totaal hebben we dus 120 dieren maximaal per experiment nodig (8 experimentele groepen x 15 dieren).

Om 120 dieren te verkrijgen hebben we 15 moeders nodig indien elk nest precies 4 mannelijke en 4 vrouwelijke pups bevat. Dit zal echter niet het geval zijn in verband met de natuurlijke variatie van nestgrootte en dus zullen meer nesten nodig zijn; wij rekenen op gemiddeld 5 extra moeders per experiment.

Nestgrootte zal worden aangepast zodat een nest tenminste 6 en maximaal 8 jongen bevat. Nesten met minder dan 6 pups kunnen worden gebruikt om andere nesten aan te vullen tot 6 tot 8 jongen. Ook van een nest met meer dan 8 jongen zullen de jongen gebruikt worden om andere nesten aan te vullen tot 6 tot 8 jongen. Elk (eventueel aangepast) nest zal tenminste 3 mannelijke en 3 vrouwelijke pups bevatten.

Zoals boven genoemd verwachten dat we dus 15 (theoretisch minimum aantal dieren indien alle natuurlijke nesten bestaan uit minimaal 8 dieren en een nagenoeg 50:50 sekse verdeling) plus 5 extra moeders (waarvan de pups gebruikt kunnen worden om nesten aan te vullen) nodig te hebben per experiment om alle groepen dieren te vullen zodat we over 120 dieren van de juiste experimentele groep beschikken. We verwachten dus gemiddeld 20 moeders per experiment nodig te hebben.

Zoals boven te lezen is hebben we 10 deelexperimenten. We hebben daarom maximaal $10 \times 20 = 200$ moeders nodig.

We hebben 120 pups nodig per experiment. We hebben daarom dus $120 \times 10 = 1200$ pups nodig."

2) Kunt u verduidelijken op welk moment de intracerebroventriculair injectie wordt gegeven? Het eerste moment van opofferen wordt beschreven op PN dag 4, als de injectie op jongere leeftijd plaatsvindt wat is dan, in uw ervaring of verwachting, het risico op kannibalisme door de moeder, welke effecten heeft dit dan op uw experimentele opzet en is dit opgenomen in de 1% uitval die u incalculeert?

Er staat nu in (onderdeel A) dat dat op PND 0 en 1 gebeurt, zoals in de literatuur beschreven staat (Amateau and McCarthy, 2004; Lenz et al. 2013). In onderdeel A staat nu: "Onder anesthesie worden de pups bilateraal intracerebroventriculair geïnjecteerd met [REDACTED] of met PBS als controle (de 3 andere groepen) op PND 0 en 1."

In onderdeel B staat nu dat de pups 1 voor 1 uit het nest gehaald wordt om de icv injectie te ondergaan. Op deze manier geeft dat de minste stress voor de moeder (al haar andere pups zijn dan dus nog aanwezig in het nest). Ik heb zelf ervaring met deze manier van pups weghalen bij de moeder op PND 3 en dat leidde in geen enkel geval tot kannibalisme. Ik verwacht ook in dit geval geen kannibalisme.

De 1% uitval is een algemene onvoorziene uitval.

De tekst in onderdeel B bevat nu het volgende:

"De pups worden voor de intracerebroventriculair injectie een voor een weg gehaald bij de moeder om de intracerebroventriculair injectie te ondergaan. Indien de pups op deze manier tijdelijk worden gescheiden van de moeder (en niet alle pups tegelijkertijd bij de moeder worden weggehaald) is onze ervaring dat deze tijdelijke verwijdering uit het nest geen kannibalisme bij de moeder zal veroorzaken. We verwachten dus niet dat onze manipulaties uitval van dieren veroorzaakt.

In overleg met de ervaringsdeskundige binnen het instituut calculeren wij een algemene onvoorziene uitval van dieren van 1%. 1% van 1400 dieren is 14.

Het totaal maximaal aantal dieren dat wij aanvragen voor 5 jaar is dan $(1200+200+14): 1414$ "

3) kunt u de beschrijving van de deelexperimenten bij punt B op blz 3, verduidelijken? U beschrijft het doen van gedragstesten op PN dag 60 als een vermindering/verfijning; dit wordt niet helder uit de huidige beschrijving, omdat dit deelexperiment hier als een aparte groep (groep 5) wordt beschreven en ook de berekening van het aantal dieren op 10 deelexperimenten is gebaseerd. Het is niet helder waar het aspect van vermindering op is gebaseerd.

U heeft gelijk; dit was een foutje aangezien het niet doorberekend was in het aantal proefdieren. Bij nader inzien is het toch beter om de dieren die voor gedrag gebruikt worden niet ook voor een vervolgs experiment te gebruiken. Het vervolgs experiment komt dan namelijk daarbij mogelijkerwijs in de problemen. Dieren van 1 stress paradigma worden dan gebruikt in gedragsexperimenten, terwijl dieren van het andere stress paradigma niet worden gebruikt. Aangezien de vergelijking van deze stress paradigmas interessante inzichten kunnen verschaffen (verschillende effecten van verschillende soorten prenatale stress op [REDACTED] zou het erg zonde zijn als we deze groepen niet zouden kunnen gebruiken doordat de ene groep ook op gedrag was getest. Dit is aangepast in onderdeel D: daar wordt niet meer genoemd dat dieren voor zowel gedrag als [REDACTED] experimenten gebruikt worden.

4) in de beschrijving van de deelexperimenten benoemd u bij groep 5 dat het middel om prenatale stress te induceren 'nog wordt besloten'. Op basis waarvan besluit u dit in fase 1? Is dit hetzelfde middel als benoemd in fase 2 en 3?

Dit is nu verhelderd. We zullen hier kiezen voor ofwel de ontstekingsinducerende stof ofwel de chronische variabele stress. Deze keuze zal gemaakt worden op basis van de effect sizes van deelexperimenten 1 tot en met 4; we kiezen voor de methode die het grootste effect veroorzaakt. Als we die keus gemaakt hebben, dan zal deze methode ook gebruikt worden in de deelexperimenten van fase 2 en fase 3.

De tekst in onderdeel B bevat nu het volgende:

“Het project bestaat uit 10 deelexperimenten

Fase 1.

1. [...]

5. Rol van [REDACTED] en prenatale stress op sociaal gedrag en cognitieve vaardigheden op PND60 (middel wordt nog besloten op basis van de resultaten van deelexperiment 1 t/m 4. Afhankelijk van de effect sizes van onze manipulaties op microglia activatie wordt of de ontstekingsinducerende stof of de chronische variabele stress gekozen als methode om prenatale stress te veroorzaken).

[...]

Fase 2

8. Effect van [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten; middel zal zelfde zijn als in deelexperiment 5) op pruning op PD60 - gemeten door middel van immunohistochemische technieken

9. Effect van [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten; middel zal zelfde zijn als in deelexperiment 5) op [REDACTED] op PD60 - gemeten door middel van electrophysiologische technieken

Fase 3

10. Effect van [REDACTED] en prenatale stress (middel wordt nog besloten; middel zal het zelfde zijn als in deelexperiment 5) op genexpressie en epigenetische status van relevante promoters op PND60.”



Van: ZBO-CCD
Verzonden: dinsdag 26 mei 2015 16:12
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD115002015113
Bijlagen: aanhouden.beoordelen113.doc; Aanvraag formulier 11500.pdf

Geachte [Redacted],

Op 18 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immune System Involvement in sex -specific vulnerability to prenatal stress" met aanvraagnummer AVD115002015113 In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

In de bijgevoegde brief kunt u lezen welke informatie wij nog van u nodig hebben om de aanvraag verder in behandeling te nemen, deze brief wordt u ook per post toegezonden. Ter verduidelijking voeg ik bij deze mail ook het aanvraagformulier zoals wij dat ontvangen hebben met de niet correcte ondertekening.

Met vriendelijke groet, [Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.zbo-ccd.nl

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



Centrale Commissie Dierproeven

14

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

██████████
██████████
██████████ Utrecht
████████████████████

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD115002015113

Factuur

Factuurdatum 13 mei 2015
Vervaldatum 12 juni 2015
Factuurnummer 201570113
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Omschrijving

Bedrag

Betaling leges projectvergunning dierproeven
Betreft aanvraag AVD115002015113

€ 741,-

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

Van: ZBO-CCD
Verzonden: maandag 8 juni 2015 15:29
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: FW: aanvullende informatie AVD115002015113
Bijlagen: aanhouden.beoordelen113.doc; Aanvraag formulier 11500.pdf

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog geen reactie gehad op de bijgevoegde vragen en nog niet het juiste aanvraag formulier ontvangen. Wij willen u erop wijzen dat de termijn voor beantwoording van de vragen bijna verstreken is. Zolang niet het juiste aanvraagformulier of een machtiging is ontvangen is het dossier formeel niet compleet en kan niet verder in behandeling worden genomen.

Mocht u binnen 2 dagen alsnog de vragen kunnen beantwoorden en het juiste aanvraagformulier danwel machtiging naar ons toestuurt dan zal de aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering worden behandeld,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Van: ZBO-CCD
Verzonden: dinsdag 26 mei 2015 16:12
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD115002015113

Geachte [REDACTED]

Op 18 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immune System Involvement in sex -specific vulnerability to prenatal stress" met aanvraagnummer AVD115002015113 In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

In de bijgevoegde brief kunt u lezen welke informatie wij nog van u nodig hebben om de aanvraag verder in behandeling te nemen, deze brief wordt u ook per post toegezonden. Ter verduidelijking voeg ik bij deze mail ook het aanvraagformulier zoals wij dat ontvangen hebben met de niet correcte ondertekening.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.zbo-ccd.nl

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

[Redacted]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 28 mei 2015 9:39
Aan: [Redacted]
Onderwerp: aanvullende informatie gevraagd aan aanvrager/onderzoeker betreft dossier [Redacted]

Geachte lezer,

Onderstaande vragen zijn door de CCD gesteld aan de aanvrager / onderzoeker. Deze projectaanvraag is in uw DEC behandeld onder dossier nummer [Redacted]. Voordat deze vragen zijn gesteld aan onderzoeker is er contact geweest met het secretariaat van uw commissie om te vragen of deze vragen ook al in uw vergadering zijn besproken.

Uit uw beschrijving van de experimentele aanpak worden een aantal beslismomenten met betrekking tot de fok van de dieren niet helemaal duidelijk:

- 1) Uw beschrijving van het aantal moederdieren die u nodig denkt te hebben om het benodigde aantal nakomelingen te hebben is gebaseerd op 8 nakomelingen per nest (4m/4f). Hoe gaat u om met nesten welke kleiner in aantal zijn of niet de juiste geslachtsverhouding hebben? Worden deze nesten in zijn geheel uitgesloten van het onderzoek of voegt u nesten samen om tot de gewenste nestgrootte te komen? Kunt u dit punt in de beschrijving dierproeven verduidelijken en op basis van uw beslismomenten het aantal moederdieren aanpassen indien nodig?
- 2) Kunt u verduidelijken op welk moment de intracerebroventriculair injectie wordt gegeven? Het eerste moment van opofferen wordt beschreven op PN dag 4, als de injectie op jongere leeftijd plaatsvindt wat is dan, in uw ervaring of verwachting, het risico op kannibalisme door de moeder, welke effecten heeft dit dan op uw experimentele opzet en is dit opgenomen in de 1% uitval die u incalculeert?
- 3) Kunt u de beschrijving van de deelexperimenten bij punt B op blz 3, verduidelijken? U beschrijft het doen van gedragstesten op PN dag 60 als een vermindering/ verfijning; dit wordt niet helder uit de huidige beschrijving, omdat dit deelexperiment hier als een aparte groep (groep 5) wordt beschreven en ook de berekening van het aantal dieren op 10 deelexperimenten is gebaseerd. Het is niet helder waar het aspect van vermindering op is gebaseerd.
- 4) In de beschrijving van de deelexperimenten benoemt u bij groep 5 dat het middel om prenatale stress te induceren 'nog wordt besloten'. Op basis waarvan besluit u dit in fase 1? Is dit hetzelfde middel als benoemd in fase 2 en 3?

De behandeltermijn voor dit dossier is opgeschort tot aanvrager antwoord heeft gegeven op bovenstaande vragen.

Met vriendelijke groet, [Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.zbo-ccd.nl

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

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoide artritis. |

2 Categories

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

Reumatoïde artritis (RA) is een invaliderende ziekte als gevolg van chronische gewrichtsontstekingen en ernstige erosie van kraakbeen en bot in meerdere gewrichten. Hierbij speelt de ontstekingsreactie een cruciale rol in de initiatie van de pathologie. Osteoartritis (OA) daarentegen, is lange tijd beschouwd als een "wear-and-tear" ziekte, waarbij een ontstekingsreactie in het synovium geen significante rol speelt, aangezien deze veel minder hoog is vergeleken met RA patiënten. De laatste jaren is er een groeiende interesse voor de rol van de ontstekingsreactie in OA en wordt verondersteld dat de relatief lage synoviale activatie wel degelijk een grote rol kan spelen in de ontwikkeling van schade aan kraakbeen en bot tijdens OA, echter de exacte rol moet nog worden onderzocht (Bryan & Terkelbaut, 2015, Nat Rev Rheumatol).

De infiltratie van immuun-cellen in het ontstoken gewricht is een cruciaal proces in de instandhouding van de ontsteking en de daaropvolgende schade aan bot en kraakbeen. Naast granulocyten, zullen ook monocyten de ontsteking infiltreren. In het ontstoken gewricht kunnen de monocyten pro-inflammatoire cytokines en chemokines afgeven, maar ze kunnen ook differentiëren tot macrofagen. Dit zal de ontsteking in stand houden en zal leiden tot bot en kraakbeen schade in beide ziektebeelden.

In muizen zijn twee sub-populaties van monocyten beschreven; Ly6C-high monocyten die als pro-inflammatoir worden beschouwd en Ly6C-low monocyten welke een rol spelen in herstel mechanismen van weefsel. Een functionele rol van beide monocyte populaties is al aangetoond in meerdere inflammatoire (met name atherosclerose) en infectie-ziekten (Swirski & Nahrendorf, 2013, Science). In deze studies zijn de verschillende functies van beide subsets uitvoerig onderzocht en is gebleken dat beide monocyte subsets in verschillende fases van het ziekteproces de ontsteking infiltreren. Eerst vindt infiltratie van de Ly6C-high monocyten plaats, welke de ontsteking in stand houdt en het eventuele debris van cellen verwijderd, daarna vindt influx van Ly6C-low monocyten plaats welke de resolutie van de ontsteking stimuleert en eventueel beschadigd weefsel kan helpen herstellen. Deze differentiële infiltratie van de verschillende monocyte populaties wordt gecoördineerd in het beenmerg (BM) en milt, in beide organen vindt monocyte productie plaats. Het is echter nog niet duidelijk welke signalen verantwoordelijk zijn voor de differentiële efflux van de verschillende monocyte subsets vanuit het BM of milt (Pitet et al., 2014, Ann N Y Acad Sci).

Mogelijke signaal stoffen die hierbij betrokken kunnen zijn, zijn [REDACTED]. Deze eiwitten zijn leden van de [REDACTED] familie van eiwitten die geclassificeerd kunnen worden als [REDACTED] of [REDACTED]. [REDACTED] komen tijdens RA en OA in grote hoeveelheden vrij in het ontstoken gewricht en worden voornamelijk afgescheiden door geactiveerde macrofagen (Foell et al., 2007, Nat Clin Pract

[REDACTED] De macrofaag zorgt vervolgens voor verdere [REDACTED] secretie door andere macrofagen via de [REDACTED] te

activeren. De vrijgekomen [redacted] stimuleren vervolgens de productie van kraakbeen-afbrekende enzymen. Naast een directe rol in kraakbeenschade spelen [redacted] ook een rol in de migratie en infiltratie van immuun cellen (o.a. monocytten) naar de ontsteking. Daarnaast wordt de differentiatie van monocytten in het BM gereguleerd via [redacted] activatie. Naast een systemisch effect van [redacted] op de monocytose in BM en milt, kunnen [redacted] ook een effect hebben op de inflammatoire capaciteit van de monocytten en kan het een lokaal effect hebben in het kniegewricht waarbij het de infiltratie van monocytten verhoogd.

Naast [redacted] zijn ook andere signaal stoffen en cytokines mogelijk betrokken bij de regulatie van monocyte differentiatie, infiltratie en activatie, zoals bijvoorbeeld moleculen betrokken bij [redacted] signaling, zoals [redacted] en [redacted] (Jin & Cao, 2014, Aust Dent J) en moleculen betrokken bij [redacted] metabolisme, zoals [redacted] en [redacted] (Murphy et al., 2011, JCI).

De functionele rol van deze twee monocyte sub-populaties tijdens de ontwikkeling van experimentele RA of OA zijn echter nog niet beschreven. De studies in dit projectvoorstel zullen derhalve unieke inzichten verschaffen in de mogelijke rol van verschillende monocytten in RA en OA en daarmee internationaal wetenschappelijk toonaangevend zijn. Daarnaast zal deze informatie inzicht geven in mogelijke nieuwe targets voor therapie tegen RA en OA, welke ook getoetst zullen worden in deze studie. **Dit onderzoek vindt plaats binnen een goedgekeurd [redacted] project.**

3.2 Purpose

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

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

De hoofddoelstelling van dit projectvoorstel is:

- **Het vaststellen en karakteriseren van infiltrerende Ly6C-high en Ly6C-low monocytten in het aangedane gewricht tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA.**
- **Het bepalen welke signaal stoffen uit het aangedane gewricht een rol spelen in de infiltratie van Ly6C-high en Ly6C-low monocytten.**
- **Toetsen of inhibitie van deze signaal stoffen zal leiden tot een vermindering van ontsteking en gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA.**

Het projectvoorstel bestaat uit meerdere onderdelen met elk hun eigen doelstelling:

1. Het vaststellen van de infiltratie van Ly6C-high en -low monocyte in het aangedane gewricht in verschillende stadia van experimentele OA en RA (dierproef 1).
2. Het karakteriseren van de functionele aspecten van Ly6C-high en -low monocytten in verschillende OA en RA modellen middels ex-vivo en in-vitro experimenten (dierproef 2).
3. Het vaststellen van systemische effecten van signaalstoffen (b.v. [redacted] etc.) op de differentiatie en efflux van Ly6C-high en -low monocytten in BM en milt in verschillende OA en RA modellen (dierproef 3).
4. Het karakteriseren van de rol van signaalstoffen (b.v. [redacted] etc.) op de functionele aspecten van Ly6C-high en -low monocyte in verschillende OA en RA modellen middels ex-vivo en in-vitro experimenten (dierproef 4).

5. Het vaststellen van de lokale effecten van signaal stoffen (b.v. [REDACTED] etc.) in het gewricht op de infiltratie van Ly6C-high en -low monocytten in verschillende OA en RA modellen (dierproef 5 en 6).
6. Het bepalen van de potentie van het inhiberen van monocytten om zo ontsteking en gewrichtsschade in verschillende OA en RA modellen te verlagen (dierproef 7).
7. Het toetsen van therapeutische targets om Ly6C-high monocyte infiltratie te beperken en zo de ontsteking en gewrichtsschade in verschillende OA en RA modellen te verlagen (dierproef 8).

Wij zijn van mening dat bovenstaande doelstellingen haalbaar zijn, om met de dierproeven beschreven in dit projectvoorstel, binnen de gestelde periode van 5 jaar deze studies uit te voeren. Alle expertise en middelen zijn aanwezig op de afdeling [REDACTED] om deze doelstellingen te behalen. Er is ruime ervaring in het induceren en histologisch analyseren van de gewrichtsschade van alle beschreven OA en RA modellen. Daarnaast zijn alle muizen in fok in het [REDACTED] of verkrijgbaar bij gangbare leveranciers.

3.3 Relevance

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

Deze studie zal voor het eerst inzicht verschaffen in de rol van Ly6C-high en -low monocyte infiltratie in ontstoken gewrichten tijdens RA en OA. Daarnaast zal voor het eerst onderzocht worden of een lokaal inflammatoir signaal een systemisch effect kan hebben op de differentiatie en efflux van monocyte sub-populaties in het BM of milt waardoor een positieve feedback ontstaat die de ontsteking in deze ziektebeelden in stand kan houden. Deze studie naar het werkingsmechanisme van monocytten betrokken bij het ontstaan en verergeren van RA en OA zal tevens een basis vormen voor nieuwe therapieën, welke zal worden getoetst in dit project.

Zowel RA als OA zijn invaliderende ziekten die een hoge prevalentie hebben. Beide ziekten hebben grote gevolgen voor het individu en de maatschappij (kosten gezondheidszorg). Kennis van de rol van monocyte infiltratie en van betrokken signaal stoffen tijdens RA en OA, kan leiden tot de ontwikkeling van medicijnen om de pro-inflammatoire effecten van deze monocytten in deze ziekten tegen te gaan.

3.4 Research Strategy

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

De beschreven dierproeven in deze project-aanvraag kunnen worden ingedeeld in 3 studies/hoofdpijnen en kunnen simultaan worden uitgevoerd:

1. Beschrijving van monocyte subsets in experimentele OA en RA
2. De rol van signaal stoffen in migratie van monocyte subsets in experimentele OA en RA
3. Het inhiberen van monocyte subsets middels het toedienen van een biological welke aangrijpt op een target eiwit aanwezig op de monocyte subsets om zo gewrichtsschade in experimentele OA en RA te beperken.

Beschrijving van monocyte subsets in experimentele OA en RA

- De kinetiek van Ly6C-high en -low monocytten zal in verschillende organen en weefsels (inclusief het aangedane kniegewricht) worden bepaald op verschillende tijdstippen tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA (dierproef 1).
- Gelijktijdig zullen de functionele karakteristieken van de twee monocyte subsets, m.b.t. ontsteking en gewrichtsschade, worden bepaald m.b.v. ex-vivo en in-vitro analyses (dierproef 2). Hiervoor zijn donor dieren nodig waarin de OA en RA modellen zijn geïnduceerd, aangezien

er geen muizen monocyte cellijn bestaat. Deze data zijn nodig om veranderingen in de monocyte subsets waargenomen in dierproef 1 functioneel te kunnen interpreteren.

De rol van signaal stoffen in migratie van monocyte subsets in experimentele OA en RA

- Centraal in dit projectvoorstel is het onderzoek naar de rol van signaal stoffen op de differentiatie en efflux van de twee monocyte subsets uit BM en milt. Hiervoor zullen de monocyte subsets worden beschreven in knock-out muizen waar deze signaal stof ontbreekt (dierproef 3). Deze data zullen aantonen dat een lokale ontsteking via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben op de regulatie van monocyte subsets in het BM en milt en zo een positieve feedback-loop bewerkstelligt voor de instandhouding van de ontsteking.
- Gelijktijdig met dierproef 3 zullen de functionele karakteristieken van de twee monocyte subsets van deze knock-out muizen worden bepaald, op een soortgelijke wijze als in dierproef 2 (dierproef 4). Hiervoor zijn donor dieren nodig van de knock-out muizen waarin de OA en RA modellen zijn geïnduceerd. Naast een effect van de signaal stoffen op de absolute hoeveelheden van de twee monocyte subsets kunnen deze signaal stoffen ook een effect hebben op de pro-inflammatoire capaciteit van de monocyte subsets.
- Simultaan aan dierproef 3 en 4 zal de lokale effecten van de signaal stoffen worden onderzocht. Naast een systemisch effect in het BM en milt kunnen de signaal stoffen ook een lokaal effect (in het gewricht) hebben op de infiltratie van de twee verschillende monocyte subsets. Dit zal worden onderzocht middels lokale injecties in het kniegewricht van de signaalstoffen.
- De lokale effecten van de signaal stoffen op de migratie van de monocyte subsets zal ook worden onderzocht middels cel tracking studies. Hier zal de migratie van Ly6C-high en -low monocyten worden onderzocht door monocyten te isoleren en te labelen en deze in knock-out muizen met experimentele OA en RA te injecteren en in vivo te imagen (dierproef 6).

Het inhiberen van monocyte subsets middels het toedienen van een biological welke aangrijpt op een target eiwit aanwezig op de monocyte subsets om zo gewrichtsschade in experimentele OA en RA te beperken.

- Daarnaast zal worden gekeken wat de functionele rol/aandeel is van monocyte infiltratie in de uiteindelijke ontsteking en gewrichtsschade in de OA en RA modellen door middel van het systemisch depletieren van monocyten middels injecties van clodronaat gevulde liposomen of liposomen gevuld met een ander cytotoxische stof (dierproef 7). Hiermee kan worden bepaald of en welk potentieel het therapeutisch blokkeren van monocyte infiltratie heeft op de ontwikkeling van OA en RA.
- Tevens zal de potentie van het inhiberen van monocyte subsets middels het toedienen van een biological die aangrijpt op een target eiwit op de monocyte subset worden getoetst (dierproef 8). Eerst zal de ontwikkeling van OA en RA worden gevolgd in knock-out muizen waar het target eiwit niet aanwezig is, waarna het effect van de biological zal worden getoetst.

Alle dierproeven kunnen simultaan van elkaar worden uitgevoerd, aangezien de uitvoering niet afhankelijk is van data uit andere proeven. De keuze van de te onderzoeken signaal stoffen en knock-out muizen wordt niet alleen gebaseerd op de uitkomst uit andere proeven, maar wordt ook bepaald door voortschrijdend inzicht in vakliteratuur en andere experimenten binnen onze afdeling tijdens de looptijd van deze aanvraag. Mocht een knock-out model of een ziektenmodel geen veranderingen laten zien in de monocyte compositie of monocyte functionaliteit dan zal deze signaal-stof of ziektemodel niet meer worden getoetst in volgende proeven. In proef 1 tot en met 7 is geen go-no go moment aanwezig aangezien het een enkel experiment betreft en geen sequentie van experimenten. Binnen proef 8 is er wel een go-no go moment aanwezig. Eerst zal het ziekteverloop in een knock-out muis, waar het target eiwit is uitgeschakeld, worden getest. Als dit succesvol blijkt te zijn zal worden overgegaan op het volgende experiment waarbij het target eiwit zal worden geblokkeerd d.m.v. een biological.

Dierproef 1

Subsets van monocytten zullen worden bepaald middels FACS, op verschillende tijdstippen in het ziekteproces van twee experimentele OA modellen, te weten collagenase geïnduceerde osteoarthritis (CiOA) en destabilisatie van de mediane meniscus osteoarthritis (DMM OA), en in twee experimentele RA modellen, te weten antigeen geïnduceerde artritis (AIA) en chronische Streptococcus cel wand artritis (chronische SCW artritis). Daarnaast zal de ontwikkeling van de gewrichtsschade worden gevolgd op deze tijdstippen middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

CiOA is een model waarbij een relatief hoge graad van ontsteking plaatsvindt en daarom een uitermate geschikt model is voor inflammatoire OA. Bij DMM OA daarentegen ontwikkelt zich weinig ontsteking. De vergelijking tussen deze 2 OA modellen zal aantonen dat de infiltratie van monocytten ontstekings-afhankelijk is, en niet wordt geïnduceerd door bot en kraakbeenschade. In dierproef 2 tot en met 8 zal daarom het DMM OA model niet meer worden gebruikt indien dit inderdaad bevestigd wordt.

AIA en chronische SCW artritis zijn twee RA modellen waarin het innate immuun systeem een grote rol speelt. Anders dan CIA, een andere gangbaar RA model waar het innate immuun systeem een belangrijke rol speelt, zal bij AIA en SCW slechts in het geïnduceerde gewricht RA ontwikkelen, dit is belangrijk om de mate van monocyte infiltratie juist te kunnen interpreteren. AIA en chronische SCW artritis verschillen van elkaar in de wijze van inductie, AIA wordt systemisch geïmmuniseerd terwijl chronisch SCW artritis alleen lokaal wordt geïnduceerd, welke mogelijk verschillen in monocyte infiltratie/functie als gevolg kan hebben.

Monocyte populaties zullen op verschillende tijdstippen worden geanalyseerd, deze gegevens zullen worden gebruikt om de meest geschikte tijdstippen voor dierproef 2 tot en met 8 te bepalen, dit om het aantal benodigde dieren te minimaliseren.

Dierproef 2

Muizen waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyte subsets waarin worden geïsoleerd uit bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals mRNA expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses.

Alleen met monocytten afkomstig van muizen met experimentele OA en RA kan de functionaliteit van de monocyte subsets worden bepaald gedurende de verschillende fasen van het ziekteproces, aangezien deze pro-inflammatoire karakteristieken plastisch zijn en kunnen verschillen tijdens verschillende fasen in het ziekteproces. Deze assays kunnen niet worden nabootst met cellijnen, aangezien er geen muizen monocyte cellijn bestaat.

Dierproef 3

CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin een bepaalde signaal stof (b.v. ██████████, ██████████ etc.) niet aanwezig is. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse, ontsteking met behulp van in vivo imagen en pijn middels gait analyse. Deze knock-out muismodellen zullen een accuraat beeld geven van de mogelijke systemische effecten van de signaal stoffen op monocyte infiltratie in de beschreven OA en RA modellen.

Dierproef 4

Knock-out muizen waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyte subsets zullen worden geïsoleerd uit bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses. Alleen met monocytetypen afkomstig van de knock-out muizen met experimentele OA en RA kan de rol van deze signaalstoffen op de functionaliteit van de monocyte subsets worden bepaald gedurende de verschillende fases van het ziekteproces, aangezien deze pro-inflammatoire karakteristieken plastisch zijn en kunnen verschillen tijdens verschillende fasen in het ziekteproces. Deze assays kunnen niet worden nabootst met cellijnen, aangezien er geen muizen monocyte cellijn bestaat.

Dierproef 5

In naïeve controle en knock-out muizen (waarin geen OA of RA wordt geïnduceerd) zal herhaaldelijk signaalstoffen (b.v. ██████████ etc.) in het kniegewricht worden ingespoten, waarna de infiltratie van monocyte subsets in het kniegewricht zal worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse, ontsteking middels in vivo imaging en pijn middels gait analyse. Alleen door lokale injecties in het kniegewricht van knock-out muizen is het mogelijk een systemisch effect van de ingespoten signaalstoffen uit te sluiten en zo alleen de lokale effecten van de signaalstoffen te bepalen.

Dierproef 6

In controle en knock-out muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd zullen op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) gelabelde Ly6C-high en -low monocytetypen worden toegediend om de migratie van deze cellen in vivo te kunnen tracken middels in vivo imaging technieken op verschillende tijdstippen na toediening. De Ly6C-high en -low monocytetypen zullen worden geïsoleerd uit donor muizen waarna ze in vitro zullen worden gelabeld. Alleen zo kunnen de effecten van de signaalstoffen op de kinetiek van monocyte migratie en infiltratie tijdens experimentele OA en RA worden onderzocht.

Dierproef 7

Muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, worden voor en tijdens de fase van monocyte infiltratie (zie dierproef 1), herhaaldelijk systemisch geïnjecteerd met clodronaat gevulde liposomen (of een ander cytotoxische stof). Dit zal leiden tot een systemisch depletie van alle monocytetypen over een langere tijd. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS en de gewrichtsschade middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Alleen met herhaaldelijk injecteren van cytotoxische liposomen is het mogelijk om over langere tijd beide monocyte subsets te depletieren (Sunderkötter et al., J. Immunol., 2004). Alleen op deze manier is het mogelijk een uitspraak te doen welk potentieel het therapeutisch blokkeren van monocyte infiltratie heeft op de ontwikkeling van OA en RA, alvorens over te gaan op het daadwerkelijk blokkeren van monocyte infiltratie met een biological (zie dierproef 8).

Dierproef 8

Uit resultaten van dierproef 1 tot en met 7 zal een target eiwit betrokken bij de migratie en infiltratie van de monocyte subsets worden vastgesteld. CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin dit target eiwit ontbreekt. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS en de gewrichtsschade middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Daarna zullen muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, voor en tijdens de fase van monocYTE infiltratie (zie dierproef 1), herhaaldelijk geïnjecteerd worden met een biological die het target eiwit inhibeert. Waarna op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) de monocYTE subsets geanalyseerd zullen worden middels FACS en de gewrichtsschade middels histologische analyse. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

De keuze welk biological (antilichaam, mimetic etc.) gebruikt zal worden zal bij de start van de dierproef gemaakt worden om zo de meest geavanceerde compound te kunnen gebruiken op dat moment.

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

Dierproef 1 en 2 hebben ten doel om de 2 monocYTE subsets te beschrijven tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA. In dierproef 1 zullen de hoeveelheden monocYten worden bepaald in verschillende weefsels tijdens de ontwikkeling van OA en RA. In dierproef 2 zullen de functionele aspecten van deze monocYten worden bepaald waardoor het mogelijk is om de data van dierproef 1 juist en functioneel te kunnen interpreteren.

Dierproef 3, 4, 5 en 6 hebben ten doel om de rol van signaal stoffen in de migratie van monocYTE subsets in experimentele OA en RA vast te stellen. In dierproef 3 zullen de hoeveelheden monocYten worden bepaald in verschillende weefsels van knock-out muizen, waar de signaal stof niet functioneel is, tijdens de ontwikkeling van OA en RA. Zo kan worden vastgesteld of deze signaal stof mogelijk een systemisch effect heeft op monocYTE migratie tijdens OA en RA. In dierproef 4 zullen de functionele aspecten van deze knock-out monocYten worden bepaald waardoor het mogelijk is om de data van dierproef 3 juist en functioneel te kunnen interpreteren. In dierproef 5 zal worden onderzocht of de signaal stoffen ook aangrijpen op het kniegewricht zelf, waarbij het lokaal de infiltratie van monocYten stimuleert. Dit zal worden onderzocht middels lokale injecties van de signaal stoffen in knock-out muizen waarin geen OA of RA is geïnduceerd. In dierproef 6 zal de kinetiek van monocYTE migratie worden onderzocht in knock-out muizen met OA en RA, middels injectie van ex-vivo gelabelde monocYten gevolgd door in-vivo imaging. Hiermee kan de snelheid en mate van monocYTE migratie worden bepaald in de afwezigheid van bepaalde signaal stoffen.

Dierproef 7 en 8 hebben ten doel om te toetsen of het inhiberen van monocYTE subsets middels het toedienen van een biological, welke aangrijpt op een target eiwit aanwezig op de monocYTE subsets, de pathologie tijdens experimentele OA en RA kan verminderen. In dierproef 7 zal worden onderzocht of depletie van alle monocYten überhaupt een verlaging van de pathologie veroorzaakt. Als dit het geval blijkt te zijn kan worden overgegaan op dierproef 8, waar eerst in knock-out muizen, waar het target eiwit niet functioneel is, de pathologie van OA en RA zal worden gevolgd om na te gaan of dit een geschikt target is. Daarna zal een biological die aangrijpt op het target eiwit worden toegediend waarmee zal worden getracht de gewrichtsschade in experimentele OA en RA te verminderen.

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	Kinetiek van monocYTE subsets tijdens experimentele OA en RA
2	Functionele analyse van monocYTE subsets tijdens experimentele OA en RA
3	Kinetiek van monocYTE subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA
4	Functionele analyse van monocYTE subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA

Serial number	Type of animal procedure
5	Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen
6	Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocyten in knock-out muizen met experimentele OA en RA
7	Systemische monocyte depletie tijdens experimentele OA en RA
8	Inhiberen van monocyte infiltratie tijdens experimentele OA en RA middels targeting van monocyte subsets



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
p/a
Geert Groteplein 10
6500 HB NIJMEGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015115
Bijlagen
2

Datum 12-05-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 mei 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015115. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
KvK-nummer: 41055629
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]@radboudumc.nl

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]@radboudumc.nl

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]@radboudumc.nl

Gegevens gemachtigde

Adres: Geert Groteplein 10
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 8 juni 2015
Geplande einddatum: 8 mei 2020
Titel project: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentale o
Titel niet-technische samenvatting: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentale o
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 8 mei 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
p/a
Geert Grooteplein 10
6500 HB NIJMEGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015115
Bijlagen
2

Datum 12-05-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 12 mei 2015
Vervaldatum: 11 juni 2015
Factuurnummer: 201570115

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015115	€ 741,00

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

DEC-advies**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer: 2015-0014
2. Titel van het project: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartitis en reumatoide artritis.
3. Titel van de NTS: Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartitis en reumatoide artritis.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]@radboudumc.nl
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 17-02-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 03-03-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking van 13-03-2015 tot 08-04-2015 en van 20-04-2015 tot 20-04-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 20-04-2015
 - advies aan CCD: 08-05-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 13-03-2015
 - Strekking van de vragen: De onderzoekers worden gevraagd de niet-technische samenvatting op bepaalde punten te herformuleren, de verwachte ernst te beschrijven en te screenen op spelfouten, weglatingen etc. Voorts worden de onderzoekers gevraagd de hoofddoelstelling duidelijker te formuleren, het aantal benodigde dieren beter te onderbouwen door toevoeging van het beoogde experimentele design, en beter toe te lichten wanneer er wel en wanneer er geen pijnbestrijding wordt toegepast en dit te onderbouwen. Verder worden de onderzoekers gevraagd of er een alternatief mogelijk is voor het tweemaal kort na elkaar toedienen van FCA, en of dit niet tot veel ongerief voor de dieren leidt. Andere

vragen betreffen kleine, soms slechts tekstuele, wijzigingen in de vergunningaanvraag.

- Datum antwoord: 08-04-2015
 - Strekking van het antwoord: De onderzoekers zijn het eens met de opmerkingen van de DEC over de niet-technische samenvatting, en hebben deze aangepast. De hoofddoelstelling is preciezer geformuleerd, het experimentele design met het aantal benodigde dieren is per dierproef toegevoegd, en de omstandigheden waarin wel of geen pijnbestrijding wordt toegepast zijn beter onderbouwd. De onderzoekers lichten toe dat zij ervaren hebben dat in de beoogde muizenstam dubbele FCA injecties niet leiden tot negatieve effecten op de huid. Het hiermee gepaard gaande ongerief is volgens de onderzoekers dus goed ingeschat.
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen: De onderzoekers worden gevraagd duidelijker te formuleren wanneer er wel en wanneer er geen pijnbestrijding zal worden toegepast.
 - Datum antwoord: 20-04-2015
 - Strekking van het antwoord: De onderzoekers hebben de genoemde formulering aangepast.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk *"Het vaststellen en karakteriseren van infiltrerende Ly6C-high en Ly6C-low monocyten in het aangedane gewricht tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA, het bepalen welke signaal stoffen uit het aangedane gewricht een rol spelen in de infiltratie van Ly6C-high en Ly6C-low monocyten, en het toetsen of inhibitie van deze signaal stoffen zal leiden tot een*

vermindering van ontsteking en gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA". Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Wetenschappelijk gezien is dat van belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan een beter begrip van de rol die deze monocyten spelen bij het ontstaan en verergeren van de gewrichtsontsteking in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van therapie gericht op monocyten duidelijk. Beide ziektebeelden zijn invaliderend en hebben een hoge prevalentie in de bevolking. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor deze ziektebeelden, wat resulteert in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC acht de aanvrager competent op dit gebied. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de rol van monocyten in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen, en mogelijke nieuwe aangrijpingspunten voor behandeling van deze ziektebeelden bij mensen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het welzijn van de dieren wordt aangetast door angst, pijn, en stress als gevolg van de volgende handelingen: intra-articulaire injecties onder anesthesie, tweemaalige subcutane injecties met zoutoplossing of Freund's Complete Adjuvant onder anesthesie, het doorsnijden van de mediane meniscus van één knie in een operatie onder anesthesie, imagen onder anesthesie, en verbloeden onder terminale anesthesie. Bovendien zal ongeveer de helft van de dieren pijn en hinder ondervinden van de gewrichtsontstekingen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties en het imagen in als licht, het ongerief als gevolg van de operatie schat de commissie in als matig, evenals het ongerief veroorzaakt door de gewrichtsontstekingen. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De rol van monocyten in osteoarthritis en reumatoïde artritis kan alleen in een proefdier worden onderzocht. Aangezien het immuunsysteem van muizen in grote mate overeenkomt met het immuunsysteem van mensen, zijn de behaalde resultaten relevant voor de behandeling van patiënten met osteoarthritis en reumatoïde artritis.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat, ondermeer doordat de onderzoekers gebruik zullen maken van een power analyse. De onderzoekers hebben modellen voor gewrichtsontsteking met weinig variatie in pathologie gekozen, zodat er zo min mogelijk dieren nodig zijn om betrouwbare resultaten te behalen. In de eerste dierproef wordt het optimale tijds punt bepaald om de gewrichtsontsteking te bestuderen, zodat in de daarop volgende dierproeven kan worden volstaan met één tijds punt. Op deze manier worden onnodige dierproeven voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 6700 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Indien mogelijk zullen de onderzoekers pijnbestrijding toepassen. Alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel. De dieren

worden dagelijks gecontroleerd en zullen worden gedood indien zij teveel ongerief ervaren. De DEC is er van overtuigd dat de onderzoekers de dierproeven zo humaan mogelijk uitvoeren. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging. Bij de dierproeven wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het ongerief voor 55% van de dieren is licht, en voor 45% van de dieren matig.

Tegenover deze nadelige gevolgen voor de dieren staat dat met dit onderzoek belangrijke inzichten kunnen worden verkregen in de rol van monocyten bij het ontstaan en in stand houden van gewrichtsontsteking in modellen voor osteoarthritis en reumatoïde artritis bij muizen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor patiënten met osteoarthritis en reumatoïde artritis. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. De beoogde gezondheidswinst en kostenreductie zijn voldoende groot dat naar het oordeel van de commissie de nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, ethisch aanvaardbaar zijn.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Appendix**Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Kinetiek van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA

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.

Subsets van monocyten zullen worden bepaald middels FACS, op verschillende tijdstippen in het ziekteproces van twee experimentele OA modellen, te weten collagenase geïnduceerde osteoarthritis (CiOA) en destabilisatie van de mediane meniscus osteoarthritis (DMM OA), en in twee experimentele RA modellen, te weten antigeen geïnduceerde artritis (AIA) en chronische Streptococcus cel wand artritis (chronische SCW artritis). Daarnaast zal de ontwikkeling van de gewrichtsschade worden gevolgd op deze tijdstippen middels histologische analyse en de expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (BM, milt, bloed en synovium) (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocyten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocyten

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

DMM OA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 de mediane meniscus van de rechterknie chirurgisch door te snijden onder anesthesie. Als controle groep voor de DMM OA muizen worden bij muizen op dag 0 een sham operatie in de rechterknie uitgevoerd onder anesthesie.

AIA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe in het gewricht worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, DMM, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en

analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester). Op 3 nader te bepalen tijdstippen tijdens de ontwikkeling van CiOA, DMM OA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 52 voor DMM OA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet-aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Verder is gekozen om op 4 tijdstippen muizen te offeren om zo de periode in de ontwikkeling van elk model te bepalen waarbij de monocyte infiltratie het sterkst is, deze gegeven zullen worden toegepast in dierproef 2 tot en met 8 om daar de juiste tijdstippen te bepalen.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model

wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén, niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat hiervoor een ontstekingsreactie nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 2 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 4 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 3 (tijdstippen) = 552 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 4 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 40 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 4 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 40 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment 552 + 40 + 40 = 632 muizen geschat.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	632	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het chirurgisch doorsnijden van de mediane meniscus (DMM), het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect

hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **chirurgisch doorsnijden van de mediane meniscus onder anesthesie**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het chirurgisch doorsnijden van de mediane meniscus (DMM), het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont.
Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA
Serial number	Type of animal procedure					
2	Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA					

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.

Muizen waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyte subsets zullen worden geïsoleerd uit BM, milt, bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals mRNA expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (BM, milt, bloed en synovium) (FACS)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten

De cellen die met FACS worden geïsoleerd zullen worden gebruikt voor verdere ex-vivo en in vitro analyses, daarom is het niet nodig om een extra groep mee te nemen voor de histochemische analyse van bot en kraakbeenschade.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op een nader te bepalen tijdstip (wanneer monocyte gehalte het hoogst is in het bloed, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de

inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Verder is gekozen om op 1 tijdstip (wanneer de monocYTE infiltratie het sterkst is) de muizen te offeren om zo het aantal dieren te beperken.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

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

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 2 gekozen om slechts 1 tijdstip te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocYten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie en 3 in vitro incubaties wordt geschat dat monocyten van 3 muizen gepooled moeten worden en dat 6 data punten nodig zijn. Dit leidt tot: $3 \times 6 \times 4$ (RNA/3 x in vitro) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 432 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment $432 + 30 + 30 = 492$ muizen geschat.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	492	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300		
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen		
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><tr><td>Serial number 3</td><td>Type of animal procedure Kinetiek van monocyte subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA</td></tr></table>	Serial number 3	Type of animal procedure Kinetiek van monocyte subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA
Serial number 3	Type of animal procedure Kinetiek van monocyte subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA			

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.

CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin een bepaalde signaal stof (b.v. [redacted] etc.) niet aanwezig is. Hierbij moet worden gedacht aan bijvoorbeeld [redacted] knock-out muizen. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse, expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR, ontsteking met behulp van in vivo imagen en pijn middels gait analyse. Deze knock-out muismodellen zullen een accuraat beeld geven van de mogelijke systemische effecten van de signaal stoffen op monocyte infiltratie in de beschreven OA en RA modellen.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocyten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocyten.

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op twee nader te bepalen tijdstippen (wanneer monocyte aantallen het hoogst zijn in bloed, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocyt

tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een aparte groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen en of deze parameters in knock-out muizen is afgenomen. Verder is gekozen om op 3 tijdstippen muizen te offeren om het aantal dieren te beperken

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 3 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 3 gekozen om 2 tijdstippen te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen om de rol van bepaalde eiwitten in de migratie van monocytten te kunnen bepalen.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijdstippen) = 276 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment $276 + 30 + 30 = 336$ muizen geschat.

Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 336 wild-type en 1008 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	336	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	1008	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

| Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA
Serial number	Type of animal procedure					
4	Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In knock-out muizen die in dierproef 3 zijn onderzocht en waarin CiOA en de 2 RA modellen zijn geïnduceerd, worden op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) geofferd, waarna de monocyt subtypes zullen worden geïsoleerd uit bloed en ontstoken gewricht middels FACS cell sorting. Functionele karakteristieken, zoals expressie en afgifte van pro-inflammatoire cytokines zal worden bepaald door middel van ex-vivo en in-vitro analyses.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyt subtypes in verschillende weefsels (FACS)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocyt (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyt subtypes in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocyt

De cellen die met FACS zullen worden geïsoleerd zullen worden gebruikt voor verdere ex-vivo en in vitro analyses, daarom is het niet nodig om een extra groep mee te nemen voor de histochemische analyse van bot en kraakbeenschade.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocyt in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking,

en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op een nader te bepalen tijdstip (wanneer monocytgehalte het hoogst is in het bloed, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Er is gekozen om de 2 monocyt subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een aparte groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen en of in de knock-out muizen een verlaging is opgetreden. Verder is gekozen om op 1 tijdstip de muizen te offeren om zo het aantal dieren te beperken.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 4 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 4 gekozen om 1 tijdstip te analyseren, om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyt migratie. Daarom is besloten om aparte

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

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen om de rol van bepaalde eiwitten in de migratie van monocytten te kunnen bepalen.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie en 1 in vitro incubatie wordt geschat dat monocytten van 3 muizen gepooled moeten worden en dat 6 data punten nodig zijn.

Dit leidt tot: $3 \times 6 \times 2$ (RNA/in vitro) \times 3 (OA/RA modellen) \times 2 (experimentele/controle groep) = 216 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) \times 3 (OA/RA modellen) \times 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) \times 3 (OA/RA modellen) \times 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment $216 + 30 + 30 = 276$ muizen geschat.

Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 276 wild-type en 828 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	276	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	828	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocyte infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocyte infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyte migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>5</td><td>Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	5	Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen
Serial number	Type of animal procedure					
5	Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In naïeve controle en knock-out muizen (waarin geen OA of RA wordt geïnduceerd) zal herhaaldelijk signaal stoffen (b.v. ██████████ etc.) in het kniegewricht worden ingespoten, waarna de infiltratie van monocyte subsets in het kniegewricht zal worden geanalyseerd middels FACS, expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR, de gewrichtsschade middels histologische analyse, ontsteking middels in vivo imaging en pijn met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen. Hiermee kan ook worden bepaald of de lokale injectie van de signaal stoffen niet zal leiden tot een verhoogde serum levels, hiermee kan een mogelijk systemisch effect van de geïnjecteerde stof worden uitgesloten.

Het is niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

Naïeve wild type en naïeve knock-out muizen zullen herhaaldelijk intra-articulair (i.a.) in de rechterknie geïnjecteerd worden met signaal stoffen

([REDACTED] etc.), terwijl in de linkerknie saline wordt geïnjecteerd, welke zal dienen als controle. De muizen zullen maximaal 7 injecties ontvangen, waarna de muizen worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Om de ontsteking na injectie van de signaal stoffen te kunnen volgen zal bij een groep wild type en knock-out muizen de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn na injectie van de signaal stoffen te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Er is gekozen om de linkerknie waar saline ingespoten wordt als controle te nemen aangezien er geen systemische effecten van de lokale injecties van signaal stoffen in de rechterknie wordt verwacht. Hiermee kan het aantal proefdieren worden beperkt. Om een systemisch effect inderdaad uit te sluiten zullen de serum levels van de ingespoten stof worden bepaald in deze muizen.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

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

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen om de linkerknie waar saline ingespoten wordt als controle te nemen aangezien er geen systemische effecten van de lokale injecties van signaal stoffen in de rechterknie wordt verwacht. Hiermee kan het aantal proefdieren worden beperkt.

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocytten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen om de rol van bepaalde eiwitten in de migratie van monocytten te kunnen bepalen.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (signaal stoffen) = 69 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (signaal stoffen) = 15 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3(signaalstoffen) = 15 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment 69 + 15 + 15 = 99 muizen geschat.

Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 99 wild-type en 297 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	99	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	297	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocyte infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocyte infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyte migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is

verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Er zal geen matig ongerief plaatsvinden aangezien geen OA of RA model zal worden geïnduceerd. De injecties van de signaal stoffen zullen slechts leiden tot een milde ontsteking en niet tot ernstige bot of kraakbeenschade. Samen met de korte experimentele periode kan het ongerief op licht worden geïndiceerd.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Er zal geen inductie van een OA of RA model plaatsvinden, hierdoor zal geen matig ongerief plaatsvinden.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

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.

Indicate the likely incidence.

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).

Licht

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 6	Type of animal procedure Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocytten in knock-out muizen met experimentele OA en RA

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In controle en knock-out muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd zullen op een nader te bepalen tijdstip (zie dierproef 1) gelabelde Ly6C-high en -low monocytten worden toegediend om de migratie van deze cellen *in vivo* te kunnen tracken middels *in vivo* imaging technieken op verschillende tijdstippen na toediening. De Ly6C-high en -low monocytten zullen worden geïsoleerd uit donor naieve en knock-out muizen waarna ze *ex vivo* zullen worden gelabeld. Alleen zo kunnen de effecten van de signaal stoffen op de kinetiek van monocyte migratie en infiltratie tijdens experimentele OA en RA worden onderzocht.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van (gelabelde) monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS en *in vivo* imaging)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht *in vivo* tijdens de ontwikkeling van ziekte (*in vivo* imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 natuurlijk aanwezige monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten

De aanwezigheid van de *ex vivo* gelabelde monocytten in het lichaam kunnen non -invasief gemonitord worden met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging.

Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses.

Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Na inductie van CiOA, AIA en chronische SCW artritis zullen de muizen een injectie van ex vivo gelabelde Ly6C-high en -low monocyten (fluorescent of radioactief) toegediend krijgen onder anesthesie, op een tijdstip wanneer de monocyte gehalte het hoogst is in het bloed (zie dierproef 1). De Ly6C-high en -low monocyten zijn afkomstig van donor dieren.

Op maximaal 5 nader te bepalen tijdstippen na injectie van de gelabelde cellen zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden ge-imaged middels optical of nuclear imaging technieken onder anesthesie. Na de laatste scan zullen de muizen niet bijkomen uit anesthesie maar zullen worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie.

Er is gekozen om de monocYTE migratie te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocYten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerknie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerknie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 6 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Onderzoek naar de migratie van monocytten in gewrichtsschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor FACS en imaging van synovium en histologie van synovium zijn 15 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 15 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 90 muizen.

Als bron voor de monocytten die ge-imaged zullen worden zijn donor dieren nodig, hiervoor wordt geschat dat 50 muizen nodig zijn.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment $90 + 50 + 30 + 30 = 200$ muizen geschat.

Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de 3 knock-out muizen, derhalve worden 200 wild-type en 600 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	200	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	600	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 7	Type of animal procedure Systemische monocyte depletie tijdens experimentele OA en RA

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.

Muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, worden herhaaldelijk systemisch geïnjecteerd met clodronaat gevulde liposomen (of liposomen met een andere cytotoxische stof). Dit zal leiden tot een systemisch depletie van alle monocytten over een langere tijd. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse en expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten. Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses. Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR. De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Na inductie van CiOA, AIA en chronische SCW artritis zal een deel van de muizen maximaal 8 injecties van clodronaat gevulde liposomen (of liposomen gevuld met een andere cytotoxische stof) ontvangen. De periode waarin deze injecties zullen plaatsvinden zal worden bepaald naar aanleiding van de resultaten van dierproef 1 en zullen de periode omvatten wanneer monocyte migratie en infiltratie plaatsvindt. Injectie van deze liposomen heeft als gevolg dat in het bloed monocyten voor een lange tijd gedepleteerd zullen zijn; Ly6C-high monocyten voor 2 dagen en Ly6C-low monocyten voor 7 dagen (Sunderkötter et al., J Immunol., 2004).

Op een nader te bepalen tijdstip na de laatste clodronaat liposoom injectie zullen zowel experimentele dieren als controle dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis om het effect van monocyte depletie op de gewrichtsschade te kunnen bepalen.

Er is gekozen om de 2 monocYTE subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocYten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linkerKnie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linkerKnie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen en of deze parameters door de clodronaat liposoom behandeling is afgenomen. Verder is gekozen om op 2 tijds punten muizen te offeren om zo de hoeveelheid proefdieren te beperken.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergelijken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 7 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 7 gekozen om 2 tijds punten te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerKnie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocyten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijdstippen) = 276 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment $276 + 30 + 30 = 336$ muizen geschat.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	336	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocyte infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantalen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde arthritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocyte infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyte migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk

ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

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?

G. Location where the animals procedures are performed

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont.
Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 8	Type of animal procedure Inhiberen van monocyte infiltratie tijdens experimentele OA en RA middels targeting van monocyte subsets

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.

Uit resultaten van dierproef 1 tot en met 7 zal een target eiwit betrokken bij de migratie en infiltratie van de monocyte subsets worden vastgesteld. CiOA en de 2 experimentele RA modellen zal worden geïnduceerd in knock-out muizen waarin dit target eiwit ontbreekt. Op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) zullen de monocyte subsets worden geanalyseerd middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse en expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Daarna zullen muizen waarin CiOA en de 2 experimentele RA modellen zijn geïnduceerd, voor en tijdens de fase van monocyte infiltratie (zie dierproef 1), herhaaldelijk systemisch geïnjecteerd worden met een biological die het target eiwit inhibeert. Waarna op nader te bepalen tijdstippen (inclusief eindpunt, zie dierproef 1) de monocyte subsets geanalyseerd zullen worden middels FACS, de gewrichtsschade middels histologische analyse en expressie van chemokines en cytokines middels q-PCR. De ontwikkeling van ontsteking zal in vivo worden bepaald met behulp van imaging technieken en pijn zal worden onderzocht met behulp van gait analyse.

Uitlees-parameters in deze studie zullen zijn:

- Aanwezigheid van monocyte subsets in verschillende weefsels (FACS)
- Gewrichtsschade aan bot en kraakbeen in aangedane gewricht (histologie)
- Expressie van chemokines en cytokines in synovium (q-PCR)
- Secretie van factoren betrokken bij de migratie van monocytten (serum analyse)
- Ontsteking/zwelling van het gewricht in vivo tijdens de ontwikkeling van ziekte (in vivo imaging)
- Pijn tijdens ontwikkeling van ziekte (loopgedrag/houding analyse)

De aanwezigheid van de 2 monocyte subsets in weefsel kan alleen met FACS analyse worden bepaald. Andere technieken zijn niet toereikend om de aanwezigheid van meerdere antigenen op cellen te bepalen, welke essentieel is voor het identificeren van Ly6C-high en -low monocytten. Pathologie van het gewricht (kraakbeen en botschade) is alleen te kwantificeren met behulp van histochemische technieken en analyses. Expressie van chemokines en cytokines in het synovium tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald door q-PCR.

De secretie van factoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA die betrokken kunnen zijn bij de migratie en infiltratie van monocytten in het aangedane gewricht kunnen succesvol worden bepaald in het serum van deze muizen.

In deze OA en RA modellen is het niet mogelijk de mate van ontsteking in het gewricht macroscopisch te bepalen. Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, tijdens het ziekteverloop non invasief te kunnen volgen zal de ontsteking met behulp van *in vivo* imaging technieken, zoals optical imaging of nuclear imaging, worden bepaald.

Om de mate van pijn, en mogelijke afname hiervan, te kunnen bepalen tijdens de ontwikkeling van OA en RA zal gebruik worden gemaakt van gait

analyse (Catwalk systeem) om de mate van belasting van de poten te bepalen tijdens het lopen en van analyse van de belasting van de poten tijdens stand middels het Incapacitance Tester systeem.

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

CiOA wordt bij wild-type en knock-out muizen (waarin het target eiwit niet functioneel is) geïnduceerd door op dag 0 en dag 2 collagenase intra-articulair (i.a.) in de rechterknie te injecteren onder anesthesie. Als controle groep voor de CiOA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag 0 en 2 saline i.a. in de rechterknie geïnjecteerd onder anesthesie.

AIA wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door op dag -28 de muizen te immuniseren met een s.c. injectie van mBSA in FCA (Freund's Complete Adjuvant) en een booster op dag -21 d.m.v. een s.c injectie van mBSA en Bordetella Pertussis in FCA. Op dag 0 wordt de artritis geïnduceerd d.m.v. een i.a. injectie van mBSA in de rechterknie onder anesthesie (alle injecties zijn onder anesthesie). Als controle groep voor de AIA muizen worden bij wild-type en knock-out muizen op dag -28 en -21 saline s.c. geïnjecteerd en op dag 0 saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie (alle injecties onder anesthesie).

Chronische SCW artritis wordt bij wild-type en knock-out muizen geïnduceerd door 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) SCW fragmenten i.a. te injecteren in de rechterknie onder anesthesie. Als controle groep voor de chronische SCW artritis muizen worden bij wild-type en knock-out muizen 4 maal (op dag 0, 7, 14 en 21) saline i.a. geïnjecteerd in de rechterknie onder anesthesie.

Om de ontsteking, en mogelijke afname hiervan, gedurende de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis de ontsteking worden bepaald met *in vivo* imaging (maximaal 8 maal). Hierbij zal een tracer of probe worden toegediend en zal na een bepaalde tijd de ophoping van deze tracer/probe worden vastgesteld met behulp van optical of nuclear imaging technieken.

Om de mate van pijn, en de mogelijke afname hiervan, tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en chronische SCW artritis te kunnen volgen zal bij een groep wild-type en knock-out muizen met CiOA, AIA en chronische SCW artritis pijn worden vastgesteld met behulp van gait analyse (Catwalk systeem) en analyse van de poot-belasting (Incapacitance Tester systeem) (maximaal 8 maal). Hierbij zullen de muizen over een glasplaat moeten lopen (Catwalk) of enkele seconden met de twee achterpoten op sensoren moeten staan om het poot-belasting te bepalen (Incapacitance Tester).

Op een nader te bepalen tijdstip (wanneer monocYTE infiltratie het sterkst is, zie dierproef 1) tijdens de ontwikkeling van CiOA, AIA en SCW artritis zullen zowel experimentele dieren als controle dieren van wild-type en knock-out muizen worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren van wild-type en knock-out muizen worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Hierop volgend zal een experiment worden uitgevoerd waarin een biological tegen het target eiwit herhaaldelijk zal worden ingespoten in wild-type muizen waarin CiOA, AIA en SCW artritis zijn geïnduceerd en in naïeve wild-type muizen over een periode wanneer actieve monocyte migratie plaatsvindt (zie dierproef 1). Op een nader te bepalen tijdstip na de laatste injectie van de biological zullen zowel experimentele dieren als naïeve dieren worden geofferd door middel van verbloeden onder anesthesie gevolgd door cervicale dislocatie. Daarnaast zullen er experimentele en controle dieren worden geofferd op het eindpunt van de verschillende modellen, te weten dag 42 voor CiOA, dag 21 voor AIA en dag 28 voor chronische SCW artritis.

Er is gekozen om de 2 monocyte subsets te analyseren in verschillende modellen van experimentele OA en RA, aangezien elk model verschilt in de mate van ontsteking en de mate waarin het innate immuunsysteem hierin een rol speelt. Zo kan inzicht worden verschaft in de rol van monocytten tijdens verschillende vormen van OA en RA. Als controle voor het aangedane gewricht is gekozen om aparte muizen met saline i.a. te injecteren en niet om de niet aangedane linker knie te gebruiken als controle. Hiervoor is gekozen aangezien een systemisch effect van de OA en RA wordt verwacht in het BM en milt waardoor ook in de linker knie effecten kunnen optreden en daardoor geen juiste controle zal zijn. Daarnaast is gekozen om de ontsteking en pijn non-invasief te monitoren tijdens de ontwikkeling van OA en RA in een aparte groep muizen. Deze analyses zullen essentiële data verschaffen of deze parameters door de biological behandeling of in de target eiwit knock-out muizen is afgenomen. Verder is gekozen om op 2 tijdstippen muizen te offeren om zo de hoeveelheid proefdieren te beperken.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden door α te delen door het aantal vergelijkingen, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde.

De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleidt worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Naast deze power analyse om het aantal dieren per groep te kunnen bepalen zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. Verder is in dierproef 8 gekozen om 2 tijdstippen te analyseren om zo het aantal proefdieren te beperken. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linker knie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocyt migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Onderzoek naar de rol van monocyten in gewrichtschade tijdens experimentele OA en RA kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbaar immuun respons als de mens.

Het totaal aantal dieren voor dit experiment is als volgt geschat.

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3(OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijdstippen) = 276 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) = 30 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment 276 + 30 + 30 = 336 muizen geschat.

Deze berekening geldt voor de wild-type muis en de knock-out muis, derhalve worden 336 wild-type en 336 knock-out muizen aangevraagd.

Voor het tweede experiment waarbij een biological wordt toegediend is het aantal dieren als volgt geschat.

Voor RNA isolatie uit synovium, FACS van synovium en histologie van synovium zijn 23 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 23 (RNA, FACS en histologie synovium) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (tijds punten) x 2 (biological/controle) = 552 muizen.

Voor pijn analyse zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (pijn analyse) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (biological/controle) = 60 muizen.

Voor het imagen van ontsteking zijn 5 muizen per groep geschat, dit leidt tot: 5 (imaging) x 3 (OA/RA modellen) x 2 (experimentele/controle groep) x 2 (biological/controle) = 60 muizen.

In totaal zijn voor het huidige experiment 552 + 60 + 60 = 672 muizen geschat.

In totaal worden er 1008 (336+672) wild-type en 336 knock-out muizen aangevraagd.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Muis	Charles River/Janvier	1008	8-20 weken oud
Knock-out muis	Eigen fok/Charles River/Janvier/Jackson	336	8-20 weken oud

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Er bestaan geen in-vitro of in-silico alternatieven voor het bestuderen van monocYTE infiltratie tijdens OA en RA. Deze studies kunnen alleen worden uitgevoerd in vertebraten met een functionerend gewricht en een vergelijkbaar immuunsysteem als de mens. Muizen zijn de 'laagste' zoogdieren die geschikt zijn voor deze studies.

Vermindering

Naast een power analyse om het juiste aantal dieren per groep te kunnen bepalen en zo te vermijden dat onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt, zijn andere keuzes gemaakt om het aantal dieren te beperken. Zo is er gekozen voor experimentele OA en RA modellen die weinig variatie in pathologie laten zien. Collageen geïnduceerde artritis (CIA) bijvoorbeeld, is ook een veel gebruikt RA model, maar hier zullen meerdere gewrichten aangedaan zijn, wat zal leiden tot meer ongerief en variatie. Daarnaast zal in dierproef 2 tot en met 8 het DMM model niet worden getest, aangezien de ontsteking erg laag is in dit model. In dierproef 1 wordt het DMM model wel getest om zo aan te tonen dat gewrichtsschade alléén niet leidt tot monocYTE infiltratie, maar dat er een ontstekingsreactie voor nodig is, zoals in het CiOA model. Verder is in dierproef 1 gekozen om meerdere (4) tijdstippen te analyseren. Hiermee kan het aantal tijdstippen (en dus het aantal dieren) in dierproef 2 tot en met 8 gereduceerd worden tot hooguit 3 tijdstippen. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken in dierproef 1, 2, 3, 4, 6, 7 en 8, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten van OA en RA op monocYTE migratie. Daarom is besloten om aparte controle muizen mee te nemen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

Verfijning

Tijdens de ontwikkeling van experimentele OA en RA zullen de muizen ongerief en pijn ondervinden. Pijn is echter een wezenlijk aspect van OA en RA pathologie en is derhalve een belangrijke uitleesparameter tijdens deze experimenten om na te gaan of de inductie van OA en RA succesvol is verlopen. Daarom is pijnbestrijding niet verenigbaar met de beschreven experimenten. Daarnaast hebben pijnbestrijdingsmiddelen mogelijk ongewenste remmende effecten op de ontstekingsreactie in de gewrichten van onze OA en RA modellen. Wel zal anesthesie worden toegepast tijdens de i.a. injecties, DMM chirurgie, in vivo imaging en euthanasie om de hieraan gerelateerde pijn en ongerief te verminderen.

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

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Er vindt geen herhaling van een experiment plaatst. Na overleg met de staf van de afdeling [REDACTED] is vastgesteld dat soortgelijke experimenten niet eerder zijn uitgevoerd binnen de afdeling of eerder gepubliceerd in een peer-reviewed-tijdschrift.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imageren van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Naast het reguliere matige ongerief die de muizen zullen ondervinden door de ontwikkeling van OA en RA is er een zeer kleine kans (< 2%) dat een muis de aangedane poot niet kan belasten en daardoor een verminderde mobiliteit vertoont.

Verder zullen de muizen een licht ongerief ondervinden van de overige handelingen beschreven in deze studie, te weten:

- **i.a. injecties onder anesthesie**
- **s.c. en i.v. injecties**
- **imaging onder anesthesie**
- **gait analyse (Catwalk)**

- **poot belasting analyse (Incapacitance tester)**
- **verbloeden onder anesthesie gevolgd door euthanasie middels cervicale dislocatie**

Explain why these effects may emerge.

Het niet belasten van de aangedane poot wordt veroorzaakt door ontsteking en bot/kraakbeen schade, welke zijn veroorzaakt door het induceren van de OA en RA modellen.

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

De volgende maatregelen zullen worden genomen om schadelijke effecten zoveel mogelijk te beperken.

Als een muis een verminderde mobiliteit vertoont doordat het de aangedane poot niet meer kan belasten zal de muis, d.m.v. cervicale dislocatie, uit het experiment worden gehaald om zo onnodig ongerief te voorkomen. Uitleesparameters voor een verminderde mobiliteit zullen zijn, het herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Om pijn tijdens de handelingen te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast. Pijnbestrijding zal plaatsvinden tijdens de volgende handelingen: het intra-articulair injecteren, het imagen van de ontsteking en het verbloeden gevolgd door euthanasie. Al deze handelingen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie d.m.v. isofluraan.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van RA en OA. Naast dat pijnbestrijdingsmiddelen een mogelijk effect hebben op de ontstekingsreactie is pijn tijdens RA en OA (en de mogelijke reductie hiervan) een belangrijke uitleesparameter in deze studie. Derhalve is pijnbestrijding tijdens OA en RA ontwikkeling niet verenigbaar met deze studie.

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.

Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont. Humane eindpunten zullen derhalve zijn: herhaaldelijk blijven liggen en het zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans dat een muis door de inductie van de OA en RA modellen zijn aangedane poot niet meer kan belasten is zeer klein en wordt ingeschat als minder dan 2% incidentie voor alle OA en RA modellen.

K. Classification of severity of procedures

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

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het is noodzakelijk de dieren te doden op het moment dat de dieren uit het experiment worden gehaald om weefsels te isoleren en te analyseren.

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

6

Geert Groteplein 10
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Radboud universitair medisch centrum
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
Huispost 628
Geert Groteplein 10

[REDACTED]
www.radboudumc.nl

KvK 41055629/4

Datum Instantie voor Dierenwelzijn
29 april 2015

Onderwerp
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag.

Factuuradres:

Radboudumc
28 F&A crediteuren
Postbus 9101
6500HB, Nijmegen

Tevens verzoeken wij u op de factuur de volgende gegevens te vermelden:

Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220
CDL projectnummer: 2015-0014
Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

[REDACTED]
Instantie voor Dierenwelzijn
instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
p/a
Geert Grooteplein 10
6500 HB NIJMEGEN


**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015115

Datum 15 mei 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 12 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartritis en reumatoïde artritis" met aanvraagnummer AVD103002015115. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

De niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat moeilijk taalgebruik, zeker bij punt 3.1. Daarnaast verwijst u bij 4.4 naar het projectvoorstel. De NTS moet echter zelfstandig leesbaar zijn, dus verwijzen naar het projectvoorstel is niet mogelijk.

Graag ontvangen wij een aangepaste niet technische samenvatting.

Strategie en tijdsplan

De onderlinge afhankelijkheid van de verschillende dierproeven is voor ons niet helder. Kunt u een tijdsplan aangeven wanneer welke proeven uitgevoerd worden? Daarnaast vragen wij u aan te geven welke proeven afhankelijk zijn van andere proeven en dus na elkaar uitgevoerd moeten worden.

Kunt u ook de go-no go momenten beschrijven binnen iedere dierproef, en of voor iedere dierproef alle vier de ziektemodellen uitgevoerd moeten worden? Op basis van welke informatie worden keuzes voor vervolgstappen gebaseerd?

Kunt u van de dierproeven waar knock-out muizen worden gebruikt (dierproef 3 t/m 6), aangeven waarop u de keuze voor de 3 knock-out muizen baseert?

Projectvoorstel

In het projectvoorstel staat in 3.4.1 over dierproef 3 "Deze data zullen aantonen dat ...". Wij nemen aan dat u hiermee bedoelt dat deze data een uitspraak kunnen doen óf lokale ontstekingen via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben.

In de Beschrijving Dierproeven staat aangegeven hoeveel dieren u wilt gebruiken voor de proeven. Hierbij is een berekening gemaakt waarop de aantallen naar boven zijn afgerond. Kunt u onderbouwen waarom u de aantallen naar boven afrondt?

Datum

15 mei 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015115

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.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.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 08 _ 06 _ 2015
- Einddatum 08 _ 06 _ 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele o
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele o
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies, document factuurgegevens


6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:


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

Naam 

Functie Instantie voor dierenwelzijn

Plaats Nijmegen

Datum 08 - 05 - 2015

Handtekening 



Central Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Radboud universitair medisch centrum

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Huispost 34

Geert Groteplein zuid 8

Route 444

T

F

www.radboudumc.nl

Datum
27 mei 2015

Ons kenmerk

Pagina
1 van 3

KvK 41055629/4

Uw kenmerk

Contactpersoon

Onderwerp

Aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven AVD103002015115

Geachte commissieleden,

Geachte voorzitter,

Naar aanleiding van uw oordeel over het onderzoeksplan zoals beschreven in de aanvraag "Regulatie en functie van monocyste subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoïde arthritis" (AVD103002015115) wil ik hierbij uw vragen/opmerkingen graag nader toelichten.

Niet-technische samenvatting

- U schrijft dat in de niet-technische samenvatting moeilijk taalgebruik wordt gehanteerd, met name in punt 3.1, en dat er in de NTS geen verwijzing naar het projectvoorstel mogelijk is.

Hierop hebben wij het taalgebruik in de NTS op meerder punten aangepast en punt 3.1 is in zijn geheel herschreven. Daarnaast is in punt 4.4 de verwijzing naar het projectvoorstel verwijderd.

Strategie en tijdspad

U heeft een aantal vragen aangaande de strategie en tijdspad van de beschreven studies in het projectvoorstel.

- Wat is het tijdspad wanneer de proeven worden uitgevoerd?
- Welke proeven zijn afhankelijk van andere proeven en worden daardoor na elkaar uitgevoerd?

Proeven 1 tot en met 8 kunnen simultaan van elkaar worden uitgevoerd, de uitvoering is niet afhankelijk van data van andere proeven. De keuze van de te onderzoeken signaal stoffen en knock-out muizen wordt niet

direct afgeleid uit voorgaande experimenten. Deze keuze wordt ook gebaseerd op de huidige kennis in de literatuur en door voortschrijdend inzicht in de literatuur of uit experimenten uitgevoerd door onszelf. Zo ligt op dit moment de focus op [REDACTED] als signaal stof, maar deze kan de komende jaren verschuiven naar andere signaalstoffen en dit is niet perse afhankelijk van eerder uitgevoerde proeven. Mocht een knock-out muis geen effect laten zien, dan zal deze signaal stof ook niet verder worden getoetst in de andere experimenten.

Alle 8 proeven kunnen in principe simultaan worden uitgevoerd, echter is het wel logisch om eerst de kinetiek en fenotype van monocytten (proef 1 t/m 4) te beschrijven voordat kan worden overgegaan tot het blokkeren van een signaal stof met een biological (proef 8).

- Beschrijf go-no go momenten binnen iedere dierproef?
- Welke informatie bepaald de keuze voor vervolgstappen?

Binnen proef 1 tot en met 7 zijn geen duidelijk go-no go momenten aanwezig, de proeven beschrijven een enkel experiment en niet een sequentie van experimenten. Tevens zijn er geen momenten waarbij de experimenten eerder kunnen worden beëindigd. Binnen experiment 8 is er wel een go-no go moment aanwezig. Eerst zal het ziekteverloop in een knock-out muis, waar het target eiwit is uitgeschakeld, worden getest. Als dit succesvol blijkt te zijn zal worden overgegaan op het volgende experiment waarbij het target eiwit zal worden geblokkeerd d.m.v. een biological.

- Dient voor elke dierproef alle 4 ziektemodellen uitgevoerd te worden?

In principe willen we alle beschreven ziektemodellen toetsen zoals zij staan beschreven in het projectvoorstel. Mocht een model geen monocyste infiltratie of functionele verschillen in monocyste populaties laten zien tijdens de ontwikkeling van het ziektebeeld dan zal dit model ook niet worden getoetst in. Dit wordt verwacht voor het DMM model in proef 1, derhalve staat het DMM model ook niet meer vermeld in proef 2 tot en met 8.

- Waarop wordt de keuze voor de 3 knock-out muizen gebaseerd?

De keuze van het knock-out model dat wordt onderzocht wordt gebaseerd op de huidige kennis in literatuur, maar ook door voortschrijdend inzicht tijdens de komende jaren binnen vakliteratuur, de resultaten uit het huidige projectvoorstel en resultaten van andere onderzoeken binnen onze afdeling. Op dit moment staan [REDACTED] centraal in onze vraagstelling (zie 3.1 van het projectvoorstel). Derhalve is de [REDACTED] muis waarschijnlijk het eerste knock-out model dat getest zal worden.

Deze informatie is samengevat toegevoegd aan 3.4.1. in het project voorstel.

Projectvoorstel

- U vraagt of met de zin "Deze data zullen aantonen dat..." in 3.4.1 wordt bedoeld dat deze data een uitspraak kunnen of lokale ontsteking via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben.

Dit is inderdaad correct. Het effect van het ontbreken van een signaal stof die specifiek tijdens een ontsteking vrij komt op de aanmaak van Ly6C-high en -low monocytten in het beenmerg en de milt zal

Datum
27 mei 2015

Ons kenmerk

Pagina
3 van 3

duidelijkheid geven of lokale ontsteking via signaal stoffen een systemisch effect kan hebben op het been merg of milt.

- U vraagt ons te onderbouwen waarom de aantallen proefdieren per studie naar boven zijn afgerond.

In onderdeel B1 wordt per studie een berekening gegeven waarmee het maximaal aantal proefdieren wordt geschat. Wij hebben aanvankelijk deze schatting naar boven afgerond aangezien een geschatte maximaal aantal dieren wordt gevraagd. Deze interpretatie is inderdaad niet juist. De berekening in onderdeel B1 geeft al het geschatte maximaal aantal dieren weer en dient niet naar boven afgerond te worden. Derhalve is het projectvoorstel aangepast en zijn de hoeveelheden die berekend zijn in onderdeel B1 van elke studie doorgevoerd in de gehele aanvraag inclusief de NTS. In totaal worden nu 6448 muizen aangevraagd in plaats van 6700.

Alle aanpassingen zoals hierboven beschreven zijn opgenomen in de aanvraag en deze aangepaste aanvraag is bijgevoegd.

Met vriendelijk groet,

[Redacted signature]

[Redacted email address]@radboudumc.nl





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015115

Datum 29 juni 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Bijlagen

1

Op 12 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoide arthritis" met aanvraagnummer AVD103002015115. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 juni 2015 heeft u de Niet-technische Samenvatting, het Projectvoorstel en de Beschrijving Dierproeven aangevuld.

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.

U kunt met uw project "Regulatie en functie van monocYTE subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoide arthritis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 29 juni 2015 tot en met 8 juni 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd d.d. 8 mei 2015. 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. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

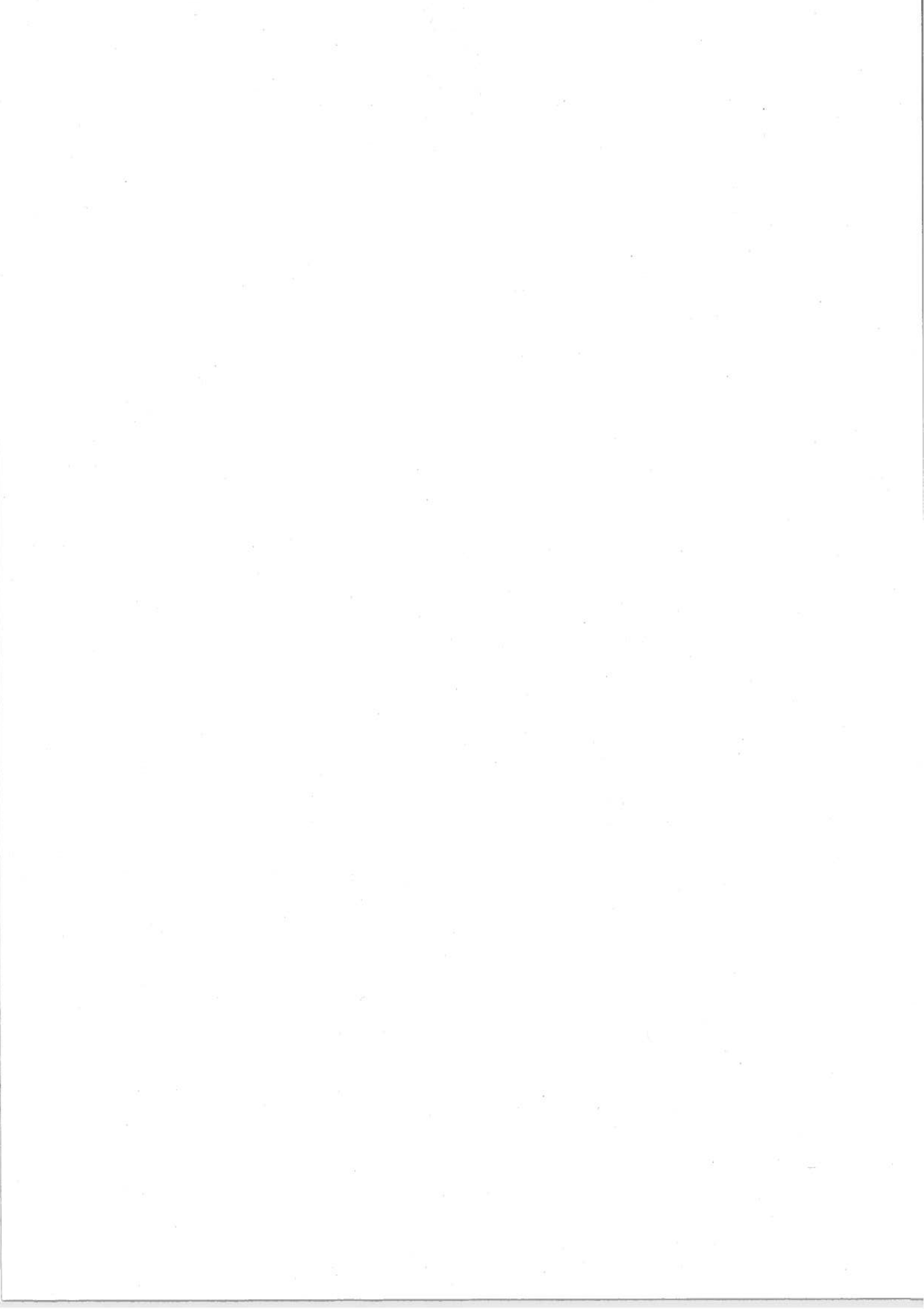
Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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



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


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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



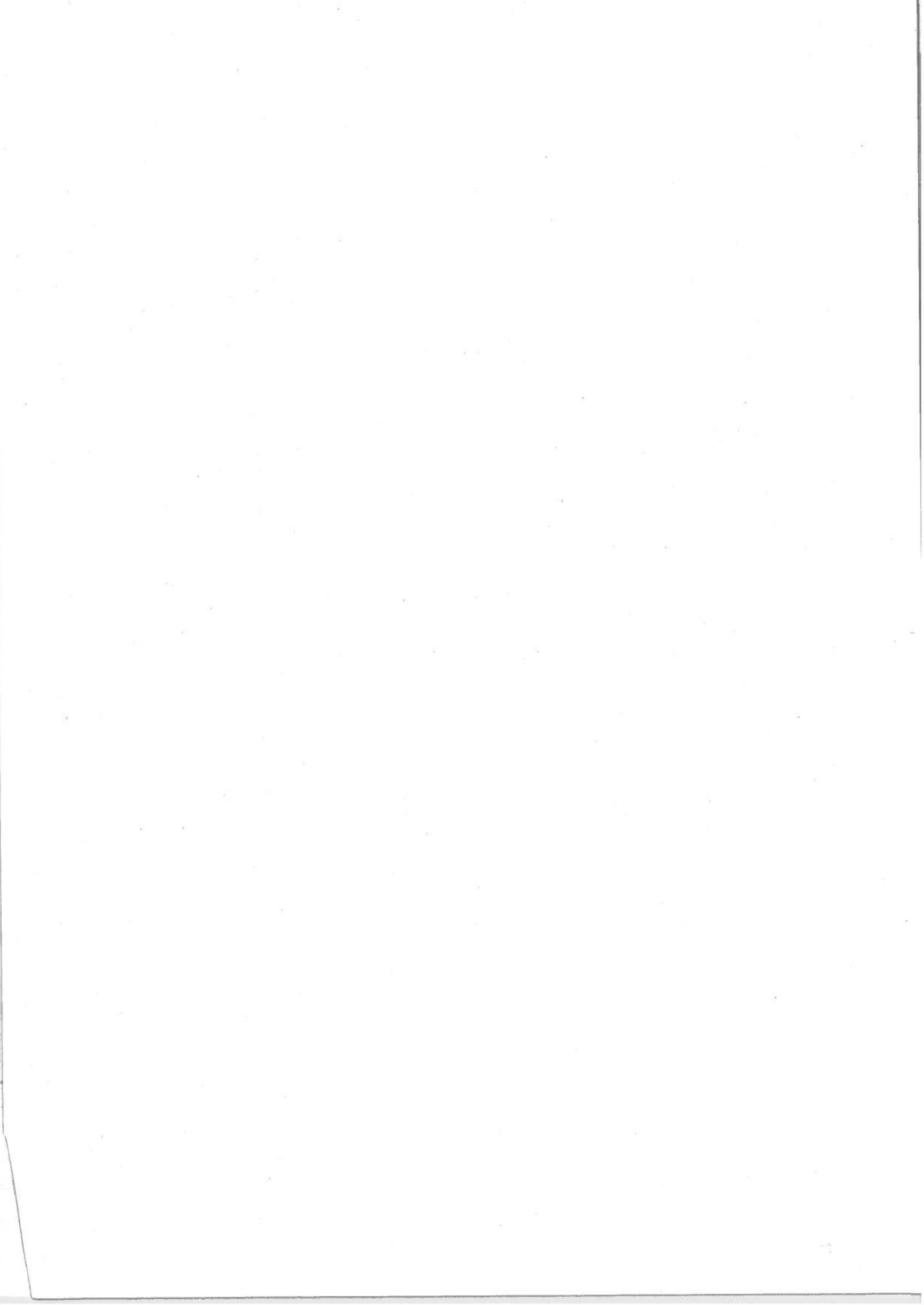
Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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





Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 juni 2015 tot en met 8 juni 2020, voor het project "Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoartritis en reumatoïde artritis" met aanvraagnummer AVD103002015115, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 mei 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals digitaal ontvangen op 8 juni 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals digitaal ontvangen op 8 juni 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 8 mei 2015, ontvangen op 8 mei 2015.

Dierproeven

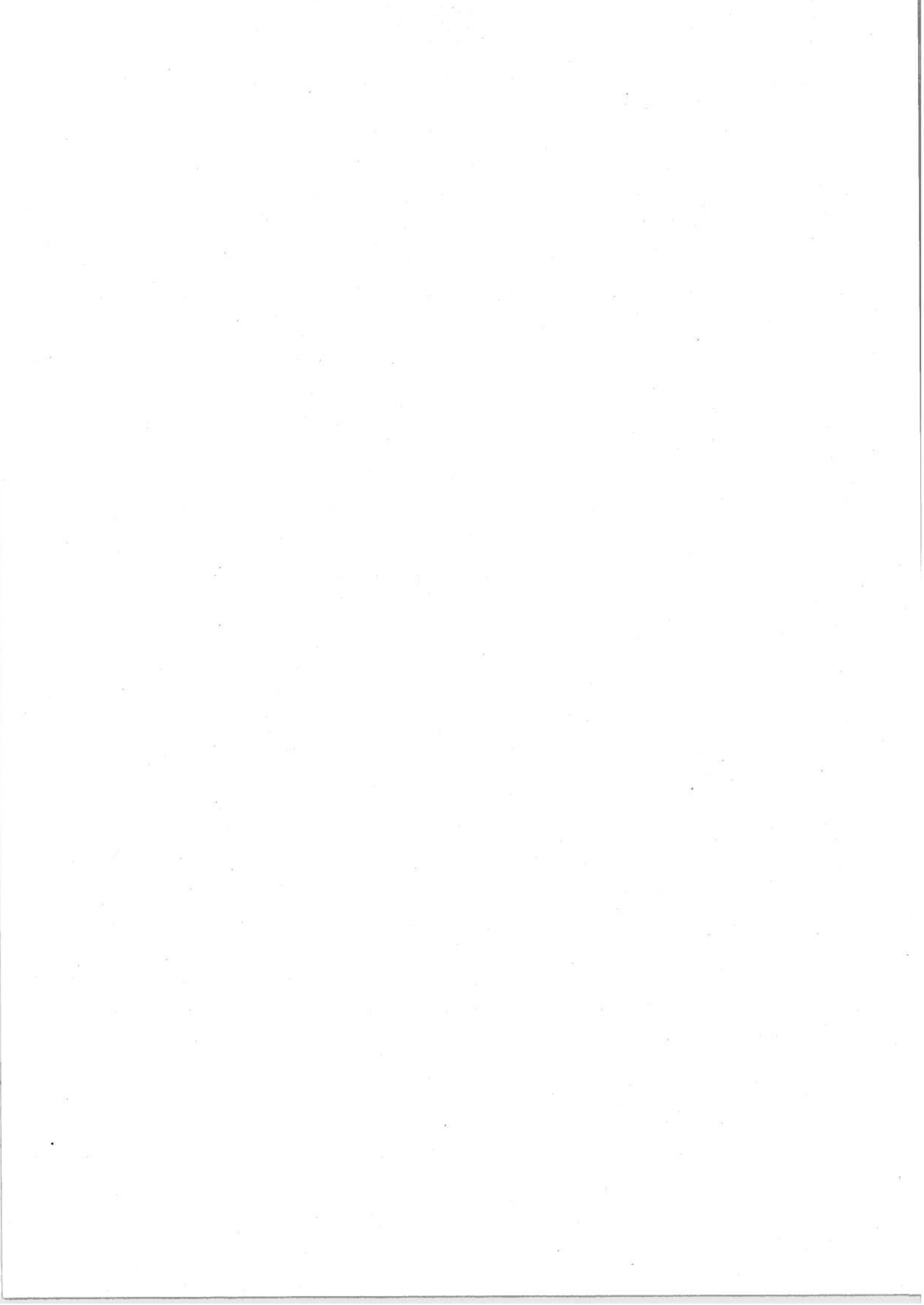
Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Kinetiek van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA	Muizen	632	Matig
Functionele analyse van monocyte subsets tijdens experimentele OA en RA	Muizen	492	Matig
Kinetiek van monocyte subsets in knock-out muizen met experimentele OA en RA	Muizen Knock-out muizen	336 1008	Matig
Functionele analyse van monocyte subsets in knock out muizen met experimentele OA en RA	Muizen Knock-out muizen	276 828	Matig
Lokale i.a. injecties van signaal stoffen betrokken bij monocyte migratie in knock-out muizen	Muizen Knock-out muizen	99 297	Licht
Injectie van gelabelde Ly6C-high en -low monocytten in knock-out muizen met experimentele OA en RA	Muizen Knock-out muizen	200 600	Matig
Systemische monocyte depletie tijdens experimentele OA en RA	Muizen	336	Matig
Inhiberen van monocyte infiltratie tijdens experimentele OA en RA middels targeting van monocyte subsets	Muizen Knock-out muizen	1008 336	Matig

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarden dat

- Voor aanvang van dierproef 8 dient eerst de kinetiek en fenotype van monocytten uit dierproef 1 t/m 4 worden beschreven;
- In dierproef 8 het go-no go moment voor het target eiwit en de invulling van het volgende experiment, wordt afgestemd met de IVD.



Datum

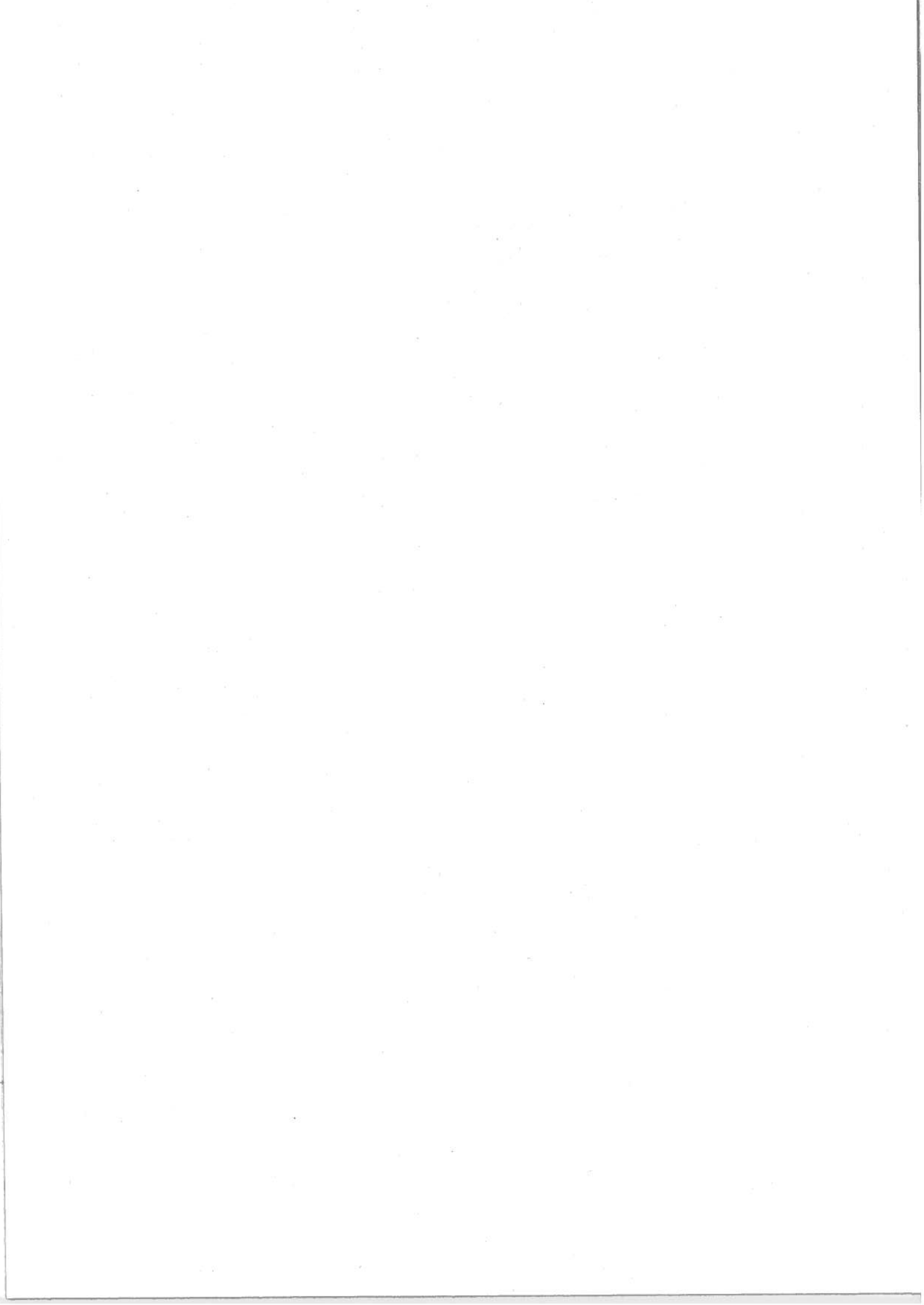
29 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015115

- In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

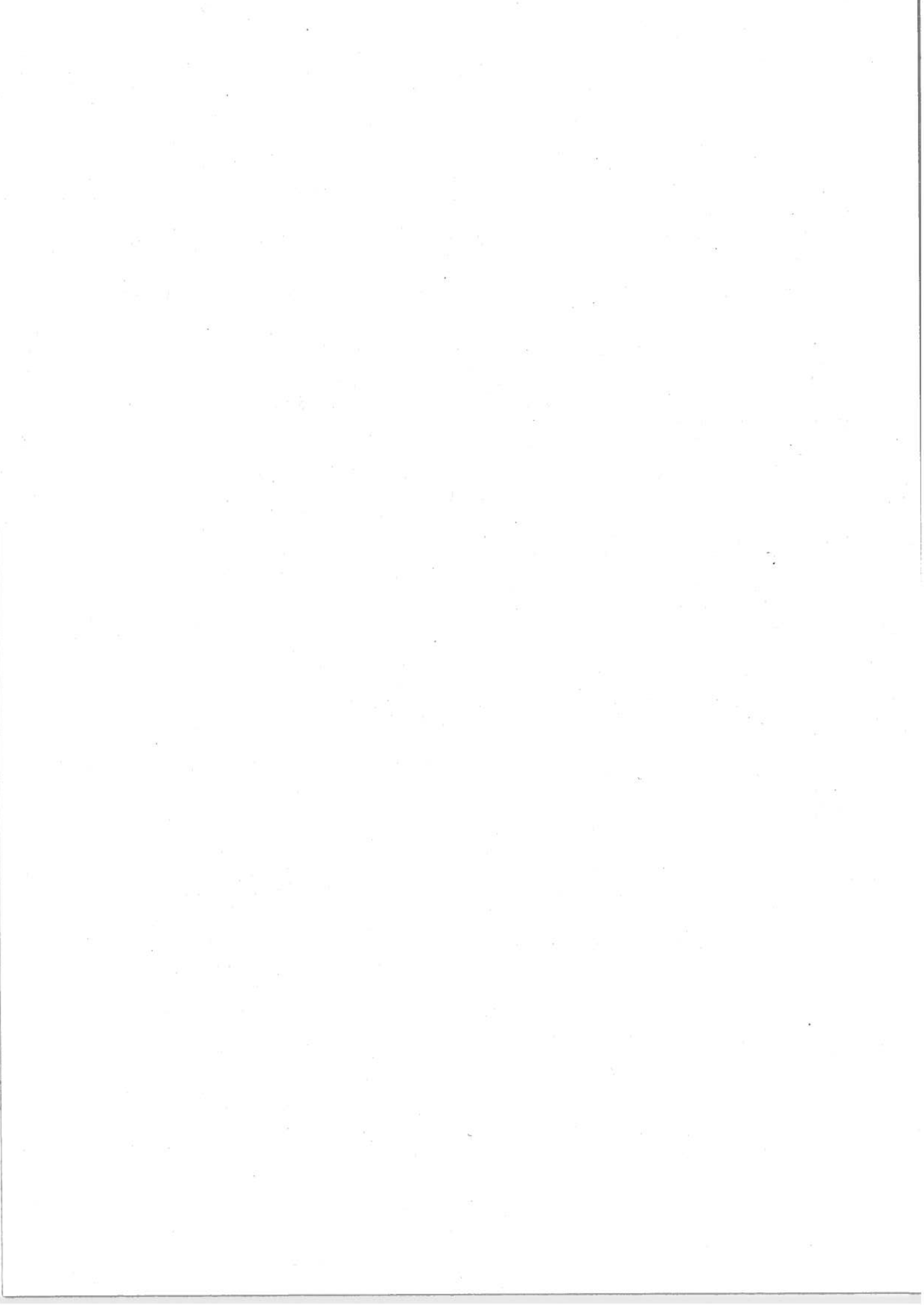
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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



Datum

29 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015115

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

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

Locatie

De dierproeven worden (niet allemaal) verricht in een inrichting van een gebruiker volgens artikel 10g van de wet.

[Redacted]

Van: [Redacted]@radboudumc.nl
Verzonden: dinsdag 16 juni 2015 13:39
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: RE: AVD103002015115
Bijlagen: 2015-0014 Factuurinformatie.pdf

Categorieën: [Redacted]

Beste mevrouw [Redacted]

Nu staan nog steeds de facturatiegegevens niet op de rekening erbij vermeld. Ik heb hier al een paar keer contact over gehad met de CCD. Op deze manier kan de factuur niet verwerkt worden bij de afdeling financiële administratie van het RadboudUMC.

Ik hoor graag wat er gedaan kan worden om dit op te lossen, aangezien het de betalingen onnodig vertraagt.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Van: ZBO-CCD [ZBO-CCD@minez.nl]
Verzonden: dinsdag 16 juni 2015 13:08
Aan: [Redacted]
Onderwerp: RE: AVD103002015115

Beste mevrouw [Redacted]

Dit is een niet-versleutelde versie.
Als het goed is lukt het nu wel.

Mocht u nog problemen hebben dan horen wij die graag.

Excuses voor het ongemak.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl Nationaal Comité advies dierproevenbeleid
www.ncadierproevenbeleid.nl

Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: [Redacted] rvo.nl

Beste CCD,

Ik kan het document niet openen, kunt u een niet-versleutelde versie verzenden?

Alvast bedankt!

Met vriendelijke groet,

██████████

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

Verzonden: maandag 15 juni 2015 11:15

Aan: ██████████

Onderwerp: AVD103002015115

Geachte mevrouw ██████████

Deze brief is op 12 mei 2015 per post naar u toegezonden.
Zie bijlage.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl Nationaal Comité advies dierproevenbeleid
www.ncadierproevenbeleid.nl

Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen. De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.

The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 1 juli 2015 16:53
Aan: [REDACTED]@radboudumc.nl
Onderwerp: Terugkoppeling besluit AVD103002015115

Geachte RUDEC,

U heeft advies uitgebracht over het project "Regulatie en functie van monocyte subpopulaties in de ontwikkeling van experimentele osteoarthritis en reumatoïde artritis". Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De voorwaarden waaronder de vergunning is verleend :

- Voor aanvang van dierproef 8 dient eerst de kinetiek en fenotype van monocyten uit dierproef 1 t/m 4 te worden beschreven
- In dierproef 8 wordt het go-no go moment voor het target eiwit en de invulling van het volgende experiment, afgestemd met de IvD.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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