

	<b>Dossier: AVD11500202518734</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	<b>2X</b>
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	<b>X</b>
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	<b>X</b>
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>X</b>

## NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Tegengaan van verouderingsprocessen om gezondheid te verbeteren
NTS-identificatiecode	NTS-NL-626936 v.1, 16-06-2025
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Veroudering Verouderingsziektes Cel veroudering Therapieën
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Multisystemisch Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Andere aandoeningen van de mens

### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Door te leven raken de cellen in ons lichaam beschadigd. Onherstelbare schade kan ertoe leiden dat cellen 'senescent' worden (= Latijn voor verouderen). Senescente cellen scheiden continue een grote reeks moleculen uit, die op termijn hun omgeving negatief beïnvloeden. Hierdoor zijn zij een directe bron van veroudering en tal van ouderdomsaandoeningen. Er is niet één soort senescence, maar er bestaan variaties. Hoe deze bij verschillende aandoeningen een rol spelen is nog niet goed duidelijk.</p> <p>Het volgende is belangrijk voor dit project:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) De aftakeling van cellen en moleculen bij veroudering is één van de meest belangrijke oorzaken van ziekten. De meeste ziektes krijgt men namelijk meestal niet op jonge leeftijd. Het tegengaan van de negatieve gevolgen van veroudering geeft dus veel mogelijkheden om ziekten tegen te gaan. Niet om onsterfelijk te worden, wel om de gezondheid langer goed te houden.</li><li>2) "Senescence" is een bewezen oorzaak van veroudering en tal van ouderdomsziekten.</li><li>3) Wij hebben gevonden dat er verschillende soorten "senescence" bestaan. Welk type voor welk probleem zorgt, is nog niet helder en een onderdeel van dit project</li><li>4) We hebben stoffen ontwikkeld tegen subtypen van senescence. We willen deze stoffen nu testen in muizen en beoordelen of we de bijbehorende ouderdomsproblemen kunnen verminderen. Als dit succesvol blijkt, kunnen de stoffen op termijn gebruikt worden om patiënten te behandelen. Ons wetenschappelijke doel is om te onderzoeken hoe verschillende soorten senescence ontstaan in veroudering /ouderdomsaandoeningen en te bepalen of nieuwe anti-senescence stoffen daadwerkelijk in staat zijn om senescente cellen te doden in muizen. Ons uiteindelijke toegepaste doel is om anti-senescence stoffen te ontwikkelen voor patiënten die lijden aan ouderdoms-aandoeningen.</li></ol>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van	<p>Concreet levert dit project het volgende op:</p> <p>Voor onderzoekers</p> <p>Senescence is een oorzaak van een groot aantal ouderdomsziekten. Hoe en welk subtype wanneer een probleem is, is minder duidelijk. Wij zullen inzichten verschaffen in hoe verschillende soorten senescence ontstaan en hoe deze precies hun omgeving beïnvloeden. Op deze manier kunnen we bepalen hoe deze cellen een rol spelen bij veroudering en ouderdomsdoeningen. Dit zal nieuwe aanknopingspunten geven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.</p> <p>Voor artsen en patiënten</p>

het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

We zullen nieuwe therapieën testen in muismodellen voor ouderdomsaandoeningen zoals spierverlies, diabetes en Alzheimer. Op het moment zijn hier nog weinig behandelmethodes voor beschikbaar. Als onze therapieën symptomen van deze ziektes verbeteren, heeft dit dus een grote impact. Het is ons doel om de meest veelbelovende stoffen uiteindelijk in de kliniek te testen.

## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Voor het onderzoek moeten enkele operaties (in maximaal 10% van de dieren) plaatsvinden onder narcose en met pijnbestrijding. Dit is eenmalig en duurt maximaal dertig minuten.</p> <p>In maximaal 50% van de dieren moeten metingen plaatsvinden onder verdoving, wat maximaal twee uur duurt. Deze metingen zullen meestal 1 keer per maand worden uitgevoerd. In de andere 50% van de dieren zullen er gedrag- en gezondheidstesten uitgevoerd worden, zoals testen om de spiersterkte of het geheugen te evalueren. Deze metingen zullen maximaal één keer per week worden uitgevoerd.</p> <p>Verder zal ongeveer 70% van de muizen injecties krijgen met een nieuwe therapie of een controle. Deze injecties worden meestal twee keer per week gezet en dit duurt ongeveer tien seconden per injectie.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Om de effecten van de door ons ontwikkelde stoffen te testen, moeten we de muizen eerst aandoeningen laten ontwikkelen die veel voorkomen bij veroudering. Net als bij patiënten kan dit leiden tot lichte pijn, angst, stress en veranderingen in lichaamsgewicht, gedrag, of conditie. Deze verschijnselen kunnen één tot twee maanden aanhouden.</p> <p>Ook kunnen de injecties en metingen leiden tot stress bij de dieren. Als er metingen gedaan zijn onder narcose, kunnen de dieren minder actief zijn voor hooguit een uur. Een operatie en bijbehorende narcose kunnen zorgen voor pijn en zwakte, hetgeen twee dagen kan aanhouden. Dit is te zien aan een veranderd gedrag, gewichtsverlies en een slechter onderhouden vacht.</p> <p>Het verwachte ongerief ligt meestal niet hoger dan 'matig'. Het wordt verwacht dat 19% van de dieren 'licht' ongerief ervaart en 74% 'matig'. Bij experimenten waarbij naar maximale levensduur wordt gekeken, is het risico op 'ernstig' ongerief groter. Wanneer een dier namelijk vroegtijdig komt te overlijden, dan omschrijven wij dit als 'ernstig' ongerief. Uiteraard is het streven dit te voorkomen, maar we schatten in dat 7% van alle dieren ernstig ongerief kan ervaren.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>11000</td> <td>0</td> <td>2152</td> <td>8101</td> <td>747</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	11000	0	2152	8101	747
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	11000	0	2152	8101	747												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden niet in leven gehouden na afloop van de experimenten, omdat hun organen nodig zijn voor analyse. We bepalen bijvoorbeeld of de nieuwe stoffen daadwerkelijk de schadelijke senescente cellen hebben verwijderd en of de organen er als gevolg ook gezonder uit zien.</p>																

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

We onderzoeken eerst de werking van onze nieuwe therapieën in celkweken en geavanceerde 3D-kweken die bestaan uit meerdere cel types. Echter, verouderingsziektes worden veroorzaakt door mankementen in verschillende cellen en organen tegelijk. De interacties tussen deze verschillende organen kan vooralsnog alleen goed bestudeerd worden in levende wezens. Verder willen we het effect van de nieuwe therapieën op verouderingssymptomen zoals geheugenverlies en spierkrachtverlies onderzoeken, wat ook alleen kan in levende wezens. Als we verbeteringen zien in deze symptomen, zou dat een enorm effect kunnen hebben op de kwaliteit van leven van patiënten.

Naast het bestuderen van symptomen, zijn muizen ook nodig om te bepalen in welke organen een nieuwe stof terecht komt, hoelang deze daar blijft en welke effecten en bijwerkingen de stof daar heeft. Dit is niet of nauwelijks te bestuderen in celweek. Door deze variabelen in muizen te bestuderen, is het veel gerichter mogelijk studies bij patiënten uit te voeren en weten we beter waar we op moeten letten.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Er worden alleen nieuwe therapieën getest in muizen als ze in eerst een bewezen effect hebben in celkweken. Verder worden er eerst experimenten uitgevoerd met een kleine groep muizen om de juiste proefopzet te bepalen. Hierdoor wordt de uiteindelijke hoeveelheid muizen verminderd. Ook testen we een nieuwe stof eerst in één experiment, voordat we uitgebreidere experimenten gaan doen. Als laatste proberen we het ontstaan van senescence, de bijbehorende ziekten en het effect van de door ons ontwikkelde stoffen, zoveel mogelijk in dezelfde muizen in de tijd volgen.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

We gebruiken verdoving tijdens scans en operaties en dienen pijnmedicatie toe voor en na operaties. Het effect van de verdoving en pijnmedicatie wordt continu geëvalueerd aan de hand van observaties in het gedrag van de dieren na afloop. Behalve door de operaties ondervinden de dieren ongerief door veroudering en de bijbehorende ziektes. We hebben uitvoerige scorelijsten opgesteld om de symptomen hiervan objectief vast te leggen en om te kunnen bepalen of het ongerief groter is dan van tevoren ingeschat.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We gebruiken muizen voor deze experimenten, omdat er veel bekend is over deze dieren in de context van verouderingsonderzoek. Er zijn veel richtlijnen beschikbaar en verouderingsonderzoek wordt veel in muizen uitgevoerd. Ook zijn muizen makkelijk handelbaar en is het haalbaar om redelijk grote groepen te behandelen en in korte tijd opereren en te scannen.

We gebruiken dieren van alle levensfasen omdat we het effect van de nieuwe therapieën willen onderzoeken in verouderde muizen of in muizen die specifieke verouderingsziektes of symptomen vertonen.

## VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	30-04-2031
<a href="#">Reden voor de beoordeling achteraf</a>	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

### AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.10.202503211525 (d5afd5c)Version date: 2025-03-21 15:25:31

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy\\_policy](#) | [Legal notices](#) | [Accessibility](#)



# Aanvraag

## Projectvergunning Dierproeven

### Administratieve gegevens

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

### 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	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat- en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80.125 3508TC UTRECHT
	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr <input checked="" type="checkbox"/> Mw
	Functie	[REDACTED]	
	Afdeling	[REDACTED]	
	Telefoonnummer	[REDACTED]	
	E-mailadres	[REDACTED]	
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr <input checked="" type="checkbox"/> Mw
	Functie	[REDACTED]	
	Afdeling	[REDACTED]	
	Telefoonnummer	[REDACTED]	
	E-mailadres	[REDACTED]	
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569	
	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag		
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee		

## 2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hieronder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2 Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hieronder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6.

## 3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01-03-2025
	Einddatum (t/m)	5 jaar na verlenen vergunning
3.2 Wat is de titel van het project?	Targeting aging pathways to promote healthspan	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Tegengaan van verouderingsroutes om gezondheid te verbeteren	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
	Postadres	Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Factuurgegevens

4.1 (Indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: UU-ASC		Afdeling:	
Straat:			Huisnummer:
Postcode:	Plaats:		
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT	
E-mail: asc.factuur@uu.nl			

4.2 (Optioneel.) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer: CB.841910.3.01.011
------------------------------------

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 2
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
Overige bijlagen, indien van toepassing	
<input type="checkbox"/> Melding machtiging	
<input checked="" type="checkbox"/> Extra Replacement Questions	

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Utrecht
Datum	[REDACTED]
Handtekening	[REDACTED]



## 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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

11500

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

UMC Utrecht

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Analysis of novel compounds in aging models

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

### 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.

This appendix describes the assessment of novel compounds directed against senescence, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism in mouse models for aging and age-related diseases. Primary outcome parameters are senescence levels, degrees of stemness, functional readouts on organ function, cognitive performance, physical performance (including frailty), and overall survival.

As described in the project proposal, the entire project consists of four phases:

- In **Phase 1** Specific subtypes of senescent cells are characterized, their (deleterious) effects on stemness and features of cellular aging determined and novel compounds aimed at counteracting these effects evaluated *in vitro* (*outside the scope of this project*)
- In **Phase 2** Mouse models are examined for the presence of (a subtype of) senescent cells, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism (see section 2: animals).
- In **Phase 3** Using validated mouse models, the potency of novel compounds from phase 1 are evaluated for their potential capacity to improve health span (and occasionally lifespan).
- In **Phase 4** the novel compounds are prepared for preclinical translation

In previous experiments [redacted], we have shown [redacted]

Further

experiments (CCD license AVD1150020199125 and outsourced to a third party) identified that more specific versions thereof can counter senescence in geriatric mice, extend their lifespan and prolong cognitive +physical function. The objective of this project is to further determine the potential of our lead compound, [REDACTED] in disease-specific models. Furthermore, we aim to assess the efficacy of a maximum of five novel compounds in these disease-specific models or models of overall aging.

The general setup of the proposed experiments will look like the following:

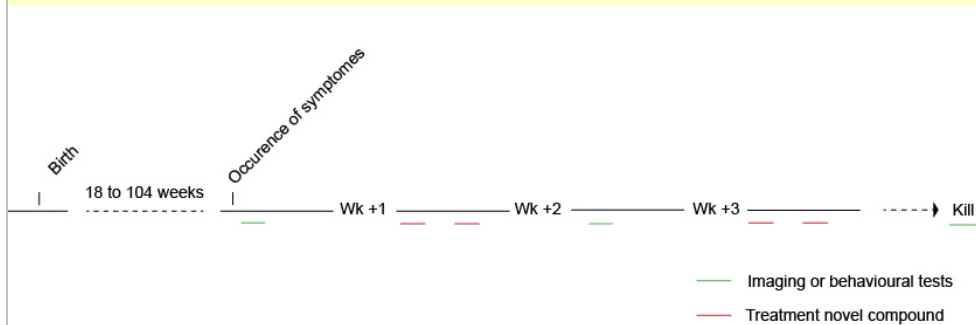
- 1) Allow the mice to reach the required age at which senescence, or defects in stemness occur. We aim to either prevent the onset of age-related diseases by removing the senescent cells early, restore differentiation, or to reverse phenotypes by treating later. For example, we start experiments between:
  - 8 and 18 weeks in accelerated aging mice, such as the HPGS mice. These mice develop the progeria phenotype at 18 weeks [2].
  - 78 and 104 weeks in naturally aged mice. At 104 weeks a reduction of tissue function becomes apparent, and the mice show age-related physical decline ([1]and our 3<sup>rd</sup> party data)
  - 8 and 104 weeks in models for ALS, such as the TDP mutant mice (mainly based on the frequent familial mutation M337V). These mice develop ALS-related symptoms as soon as 20 weeks of age [3].
  - 26 and 78 weeks in models for Alzheimer's disease, such as APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> mice. These mice show impaired spatial memory and cognitive flexibility at 9 months[4].
- 2) Analysis:
  - a) Behavior and health parameters are measured by collecting urine and feces, performing basic functional assays and drawing of peripheral blood (See below for procedures and an assessment of discomfort). These analyses include short filming of behavior, taking pictures to assess physique, analysis of grip strength and gait, temperature measurement (external non-invasive thermometer), and weighing. In parallel, passive collection of urine and feces and collection of peripheral blood. In addition, the motor function of ALS mice will be assessed by Rotarod, and the AD mice will be assessed for cognitive function by employing the Barnes test and open field test (all already mastered in our lab and/or collaborators through which they will be trained).
  - b) Imaging techniques are applied on a separate subset of mice to detect senescence, defects in stemness or age-related symptoms. From experience, we know that imaging and functional biology are best not to happen in the same cohort as they influence one another, hence the division in cohorts used for imaging, and cohorts used for functional analyses. Imaging techniques include bioluminescence imaging or Fluorescence Molecular Tomography (FMT) to assess the development of (subtypes of) senescence over time, and CT scans for bone curvature, muscle mass and tissue volume/function (<90min; under anesthesia). Where possible, these techniques are applied in the same run to minimize discomfort.
- 3) Treat the mice with anti-senescence/redifferentiation compounds vs a control (PBS, NaCl, or a negative control version).
- 4) Repeat (2)
- 5) The mice will be sacrificed either when their HEP is reached for overall survival experiments or at the same time when outcome parameters include measuring absolute senescence, its subtypes, degree of stemness as well as physiological readouts as age-related symptoms, or organ morphology.
- 6) In all experiments, tissue samples are obtained to study organ morphology, and the presence of biomarkers for compound sensitivity.

In some experiments, tissues will be collected from interim cohorts to study the levels of senescence, the levels of the target protein, and organ morphology at a specific time point. Such a cohort could be killed before treatment or after several rounds of treatment (maximum of two interim cohorts per experiment). We will add these groups when, for example, we want to correlate specific disease symptoms at a particular time point with senescence levels in a particular tissue. In addition, interim cohorts could provide valuable

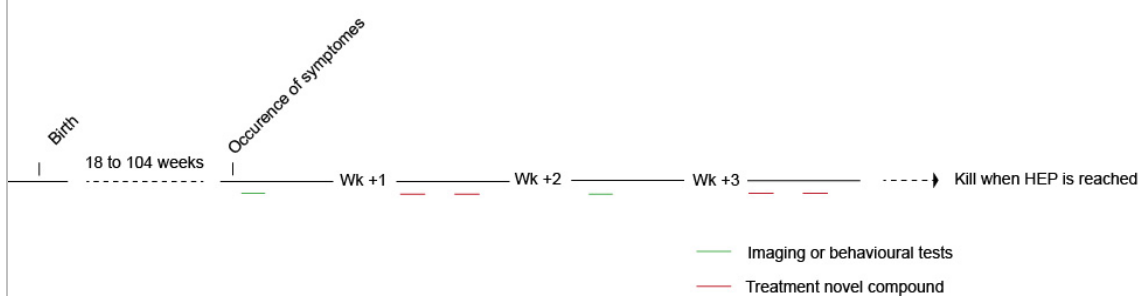
information on how long it takes to eliminate senescent cells or how long it takes for tissue to regenerate after treatment.

Examples of typical experimental timelines:

*Treatment with a novel compound to assess the effect on an age-related phenotype*



*Treatment with a novel compound to assess the effect on overall survival*



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

#### Collection of urine, feces, and peripheral blood.

Urine, feces, and peripheral blood will be collected at the beginning of an experiment, one or two intermediate points (e.g. before start of treatment), and before sacrifice. Blood will be collected from an appropriate site with a max volume of 100ul [5]. Urine and feces will be collected by placing the mouse on parafilm. At least 50ul Urine and one solid piece of feces will be collected. Repeat after 24hrs if unsuccessful. **This procedure is performed in all models, max four times over the whole experiment (max once a week).**

#### Health and behavioral tests

Basic health and strength tests are performed at most once a week. These can be combined as they are relatively fast and non-invasive. More complex tests are necessary to quantify disease-specific symptoms, such as neurodegeneration. These tests require additional time and will be conducted on a separate day, with monthly assessments as a maximum.

#### Mobility scoring

The mice are individually placed in an empty cage or in a video tracking system (e.g. EthoVision) , without bedding or food. The mice are allowed to explore for 30s while a video is made. Their mobility will be scored using tracking software. **This test is performed on all models, max once a week.**

#### Hind-limb clasping test

In the hind-limb clasping test, mice are suspended by their tail and filmed for 30 seconds against a white background. During this time, a score is assigned between 1 and 4, depending on how long one or both hindlimbs are retracted towards the abdomen. This test is used to assess motor function and neuromuscular

health in the mice and will be **performed on aged mice and Alzheimer's disease mouse models max once every two weeks.**

#### *Gait and coordination analysis*

The front and back paws of a mouse are painted with nontoxic red and blue paint, respectively, using a tissue. The mouse is placed on a piece of white paper with a shelter at the opposite end and encouraged to walk towards the shelter. This process is repeated two more times. The distance between the center of each paw print and the next is measured, as is the straight-line distance from the back paw to the adjacent front paw. The first and last paw prints are excluded from the analysis to ensure accuracy.

After the walking test, an additional assessment of the mice's motor coordination and balance is conducted. The animals, with their paws still painted, are gently held upside down at a height of 30 cm above a soft surface, then released. The mice will naturally land on their feet, and the imprint of their paws upon landing provides an indication of their motor function and balance.

Alternatively, a CatWalk system can be used (when available) to assess gait and coordination automatically. Here, a mouse is allowed to walk over a glass walkway, where its paw prints are captured by a camera and analyzed.

**These tests are performed with all mouse models, max once a week.**

#### *Strength scoring*

Grip strength will be used to assess both forelimb and hindlimb strength using two distinct tests. First, mice will be placed on a BioSeb grip strength tester, and the force exerted by all four limbs will be measured. Each mouse will be tested five times, and the highest value will be taken as its grip strength. These values will be normalized to the mouse's weight. In the second test, the mice will be gently lifted by the tail and encouraged to grip sponges with wires attached, each with different weights. If a mouse can hold on for 3 seconds, it progresses to the next weight. If it holds for only 1-3 seconds, it is given another attempt. If the mouse fails again, the last successful weight is recorded. These tests will provide valuable insights into motor deficits and muscle strength in the mice.

**These tests will be performed on (accelerated) aged mice and mouse models for ALS, max once a week**

#### *Rotarod*

The mice are placed on a rotating rod to assess their motor coordination, balance, and endurance. The test begins by placing the mouse on the rod, ensuring it is positioned to face forward. The rotation starts at a slow speed (4 RPM), which is then gradually increased to a predetermined maximum (40 RPM). As the rod spins, the mouse's performance is monitored, and the time it remains on the rod before falling is recorded. This process is repeated for several trials to track changes in motor skills over time. The primary measure of performance is the time spent on the rod, which serves as an indicator of the mouse's neuromuscular function and coordination. **This test will be performed on mouse models for ALS or Alzheimer's disease max once a month.**

#### *The Barnes Test*

This test consists of a circular platform with multiple holes around its perimeter, one of which leads to an escape box. The rodent is placed in the center of the platform and must use visual cues to locate the escape hole. The test measures the animal's ability to learn and remember the location of the escape box over repeated trials. **This test will be performed on Alzheimer's disease mouse models max once every month.**

#### *Open field test*

This test involves placing the mouse in an open, enclosed arena, marked with gridlines. The animal's movement and behavior are tracked for 10 minutes, to determine total distance traveled (to measure activity

levels), time spent in the center versus near the walls (to assess anxiety-like behavior) and rearing or grooming (to evaluate exploratory behavior and stress responses). This test will provide information on anxiety levels, locomotion, and cognitive decline. **This test will be performed on Alzheimer's disease mouse models max once every month.**

#### *Echocardiography*

Before performing echocardiography on conscious mice, they are trained over two to three sessions across three days. Prior to imaging, the chest hair is shaved, and pre-warmed ultrasound gel is applied. A small ultrasound probe is used to capture real-time images of the heart's structure and function. Key measurements include ventricular size, wall thickness, and ejection fraction. **This test will be performed on aging mice max once every month.**

All health and behavioural tests cause mild discomfort. To avoid greater discomfort, not all tests are performed on the same animal on the same day:

- The strength scoring tests are done on one day [5, 6].
- mobility scoring, the hind limb clasping test, and gait and coordination analysis are done on another day[7].
- Tests that require more time, such as the rotarod or Barnes test, are performed on a different day and less frequently [8, 9].

#### Imaging

Imaging techniques are employed to determine senescence levels or specific age-related symptoms at the start of an experiment, and to determine the effects of the administered intervention. To avoid undue stress on the animals, this procedure is **performed no more than once a week**[10]. In long overall survival experiments (>6 months), we will image maximum once a month. As mentioned above, imaging techniques are applied to a separate subset of mice from those used for behavioral analysis. In addition, only one imaging technique is used per experiment, unless mice can be kept under anesthesia for two imaging techniques and this **does not exceed 2 hours.**

The mice will be anesthetized during imaging using isoflurane. Their body temperature will be controlled using heating mats and lamps, and breathing will be monitored. Imaging will never exceed 2hrs [10]. A substrate or tracer (see explanation below) is injected when applicable prior to imaging. Subsequently, the animals are anaesthetized, the abdomen is shaved, and imaging is performed.

The imaging techniques we will include:

- Bioluminescence imaging using the BioSpace Imager. This method detects light produced by a luciferase reporter construct. To generate the bioluminescence signal, luciferase oxidizes the substrate luciferin, which is injected into the mice prior to imaging. A luciferase reporter can be specifically tailored to detect senescent subtypes by placing a relevant senescence-associated gene promoter, such as p16<sup>INK4a</sup>, upstream of the luciferase gene. This approach allows the precise detection of senescent cells expressing specific biomarkers, providing valuable insights into the localization and dynamics of senescence in tissues.
- FMT to detect fluorescence. This technique has a higher resolution than bioluminescence imaging and can therefore be applied to study senescence (subtypes) in specific areas.
- CT scans are made to assess bone curvature, muscle mass and tissue volume/function. A contrast enhancer may be injected into the bloodstream to enhance the visibility of specific organs.

#### Therapeutic intervention

Treatment is started either before the onset of symptoms to assess the ability of a novel compound to prevent them, or after the emergence of symptoms to assess reversal. The novel compounds will be administered via subcutaneous injection, intravenous injection, intraperitoneal injection, or via oral gavage with max volumes according to Diehl et al [11].

Our lead compound [REDACTED] will be mostly administered twice per week intravenously. This is based on previous experiments in which the optimal dose and frequency were determined. Similarly, novel compounds will also be administered twice per week, unless there is *in vitro* evidence to suggest otherwise. Treatments will be administered a maximum of twice per day.

Treatments will not take place on the same day as imaging or behavioral tests.

Assessment health parameters for HEP scoring

The mice are weighed, and health parameters monitored twice a week and scored according to our standardized welfare scoring list. This list was made in accordance with literature and refined based on our own experience. The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. Specific disease models will exhibit more exclusive symptoms, which will be included in the scoring list, based on literature. The overall health score determines whether the observation frequency needs to be increased or whether a humane endpoint is reached. When, according to the scoring list a HEP is reached, the mouse is euthanized, and organs are harvested.

Maximum frequency of procedure per type of experiment (For discomfort scores, see F: Classification of severity of procedures)

Experiment:	Duration of discomfort	Max. frequency	Max. number in one experiment
Accelerated aging (and other experiments <3 months)			
Collection of urine, feces, and blood	10 min	Once a week	4
Health and behavioural tests	30 min	Once/week	12
Assessment health parameters	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Therapeutic intervention	10 min	Depends on the treatment, max twice a day	28
Imaging	24hrs (narcosis)	Once/week	12
Natural aging, neurodegeneration and other long experiments (>3 months)			
Collection of urine, feces, and blood	10 min	Once a week	4
Health and behavioural tests	30 min	Once/month	12
Disease specific tests (e.g. echocardiography, rotarod)	60 min	Training+monthly	15
Assessment health parameters	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Therapeutic intervention	10 min	Depends on the treatment, max twice a day	56
Narcosis for imaging	24hrs (narcosis)	Once/month	12

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

The number of animals will be minimized by:

- Extensively testing novel compounds *in vitro*. Compounds will only be tested in mice when they show sufficient potency against senescence (subtypes) or stemness modulating properties vs healthy cells (Go-/no-go point 1).
- Only mouse models exhibiting sufficient levels of senescence/stemness and features of aging/age-related pathology will be employed to ensure a sufficiently large window of measurement for the effects, thereby reducing the number of mice required (Go-/no-go point 2).

- Performance of a statistical power analysis to determine the mice needed for full experiments. Here, we will use the Sigma and Delta based on literature, or the senescence levels we detected in the previous phase (for Sigma). We will use GPower software to calculate group sizes, using a one-tailed t-test (since we expect a beneficial effect of treatment) when comparing 2 groups and an ANOVA for multiple groups. When comparing multiple groups, we will apply a Bonferroni correction. For overall survival experiments, we will apply a log-rank test. The primary outcome parameter of interest and the variation observed in the pilot experiment will determine the input values. A statistician is consulted for every workprotocol.
- We will only proceed with experimental designs that use a maximum of 10 mice per group when animals are sacrificed at a predetermined timepoint, as literature shows significant results in several models of interest with less than 10 mice per group [12-15].
- We will only proceed with experimental designs that use a maximum of 25 mice per group to determine overall survival, as literature, as well as our own unpublished experiment, show significant results in aged mice with these numbers [13].
- To detect senescence, longitudinal imaging is used whenever possible, thus reducing the need for separate cohorts.
- When possible: testing of multiple novel compounds in parallel, since this reduces the amount of control groups necessary

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mus Musculus	Commercial breeder	8 weeks to end of life	5920 in total	Male and Female	No	C57BL/6
2	Mus Musculus	Commercial breeder	8 weeks to end of life		Male and Female	Yes	Zmpste24 (-/-) or other comparable strains that show accelerated aging.
3	Mus Musculus	Commercial breeder or collaborator in the UMC	8 weeks to end of life		Male and Female	Yes	hATXN2(CAG33)_F660; hTDP43(M337V): CAG33(pos/wt), TDP(Tg/wt), hATXN2(CAG22)_F653:CA G22(pos/wt) or other comparable strains that show ALS symptoms.
4	Mus Musculus	Commercial breeder or collaborator in the UMC	8 weeks to end of life		Male and Female	Yes	APPswe/PSEN1dE9 or other comparable strains that show Alzheimer's disease symptoms.

Provide justifications for these choices

Species	Mice are employed in this study since aging models in mice have been well-established. Moreover, they are straightforward to care for, image, and accommodate larger group sizes.
Origin	Most mice will be purchased from a commercial breeder, since this is more cost effective. Whenever our collaborators at the UMC have a surplus of mice, we prioritize using them to maximize the efficient use of available resources and reduce unnecessary breeding.
Life stages	We will either treat mice early to try to prevent the onset of age-related diseases or to reverse phenotypes by treating later. Therefore, a broad range of ages is listed here. Healthy young C57BL/6 mice of 8 to 26 weeks may be used as a control as well. The maximum age of the mice used in this project is the maximum age a mouse can live, which is approximately 36 months.

Number

Because we make use of go-/no-go moments, we will only proceed with compounds that are promising and which pass the in vitro stages in go-/no-go moment 1 (phase 1 of the project). When entering the in vivo part of this project, we thus envision the following numbers:

Phase 2 (until go-/no-go moment 2): 0

In this appendix, models will be characterized through post-mortem staining of tissues provided by collaborators or by consulting existing literature, provided that the model has been properly validated for the presence of senescent cells. Thus, we will determine whether the selected model truly contains the subtype of senescent cells of interest.

Phase 3a (until go-/no-go moment 3): max 160

Based on phase 2 we will calculate group sizes needed to reach significant conclusions (see A, statistical methods). We anticipate group sizes to remain equal or lower than 10 per group. As described in the project proposal, we will first test:

- ██████ in an aging model we did not test before. E.g., an Alzheimer's disease model or an accelerated aging model. This requires two experimental groups of max 10 mice: one control and one ██████ group (=20 total)
- Two additional ██████ and a maximum of 5 novel compounds in one model (with the respective control groups), this requires 14 experimental groups (7 control and 7 treated) of max 10 mice (=140 total).

Phase 3b (until go-/no-go moment 4): max 5760

If the initial experiments are successful, a compound can be tested across multiple aging models, with a maximum of four models. Each model will be assessed using a maximum of two key readouts across two distinct experiments, which will be one of these: (1) imaging + overall survival, (2) imaging + kill at the same time, (3) behavioral/symptom analysis + overall survival, and (4) behavioral/symptom analysis + kill at the same time. We envision a maximum of 10 mice per group when mice are sacrificed at a predetermined timepoint and a maximum of 25 for overall survival experiments (see A, statistical methods). For this phase, we have therefore included max 25 mice per group. This means 25 mice \* 16 experimental groups (8 treatment groups and 8 matching control groups) \* 4 models \* 2 readouts \* 25 mice = 3200 mice maximum (see table).

Furthermore, up to two extra timepoints of killing can be included per experiment (resulting in four additional groups: 2 control, 2 treatment). Here, 10 mice max are included per group, as this is a predetermined time of killing. This means 10 mice \* 4 groups \* 4 models \* 2 readouts \* 8 compounds = 2560 mice maximum (see table)

Phase	Experiment	Mice per group	Aging model	Read-outs	Experimental groups	Compounds	Max # mice
1	In vitro	-	-	-	-	-	0
2	Model characterization	-	-	-	-	-	0
3a	██████	10	1	1	2	1	20
3a	██████	10	1	1	2	2	40
3a	Novel compound	10	1	1	2	5	100
3b	All compounds	25	4	2	2	8	3200
3b	All compounds (interim cohorts)	10	4	2	4	8	2560

Total number of mice in experiments=5920

Gender

We strive to use both genders in order to exclude any potential sex-specific effects

Genetic alterations

Genetic modifications are necessary to induce either the rapid aging phenotype or specific age-related diseases in mouse models. These modifications lead to more pronounced

symptoms compared to naturally aged mice, making it easier to detect and measure the effects of novel therapeutics.

Strain

Examples of relevant models:

- **Naturally aged mice.** These mice show elevated senescence levels in multiple organs after 104 weeks and genetic ablation hereof was shown to be favorable [16]. Most aging models are on a C57BL/6 background.
- **Fast aging models,** such as Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) mice or mice with a similar pathology. Here, we will, for example, use mice carrying a ZMPSTE24 homozygous deletion [2]. These mice accumulate a farnesylated form of the nuclear lamina protein LMNA, which is then called Progerin. These mice exhibit accelerated aging due to this defect and develop senescence associated with various age-related phenotypes, including osteoporosis and muscle weakness.
- **ALS-specific mutant mice** to model Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). An example of a relevant model is the TDP-43 transgenic mouse combined with ATXN2-Q33 expansions, which closely mimics the pathological features seen in most ALS patients, including progressive motor deficits and neurodegeneration[3]. We obtained strong evidence of senescence in the cortex of these mice. Our *in vitro* results show that mutant TDP43 cells can be targeted by [REDACTED] providing strong rationale for *in vivo* follow-up. TDP-43 is a protein that plays a crucial role in RNA processing and is found in abnormal aggregates in the brains of ALS and AD patients. Its pathology involves cytoplasmic aggregates, causing neuronal damage and loss of motor function [17]. Additionally, intermediate-length repeat expansions in ATXN2 are ALS's most substantial genetic risk factor, enhancing TDP-43 toxicity [18].
- **Alzheimer's disease mouse models,** such as APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> mice. These mice express two proteins under prion promoters: a mutated humanized mouse amyloid beta and a mutant human presenilin 1. These mutations are both associated with AD and the mice are impaired in spatial memory and cognitive flexibility at an early age (9 months)[4, 19].
- **Other models that may become relevant based on senescence subtypes.** Additional detrimental senescent subtypes could be discovered through *in vitro* research. Using insights from these *in vitro* model systems, we can determine the need for additional aging models. These models could include those that target specific tissues or organ systems where these new subtypes are prevalent, allowing for more tailored exploration of treatment effects.

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

[Click or tap here to enter text.](#)

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Click or tap here to enter text.

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

Mice will be anesthetized during imaging. The animals will be monitored meticulously throughout the procedure and for a period afterwards.

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

- Stress during the procedures.
- Consequences of narcosis required for imaging: e.g. lethargy, drop in body temperature, abnormal gait, lack of grooming, weakness. The mice should recover within 1 day after imaging.
- Consequences of aging and age-related disease. For example, lethargy, hunched posture, muscle spasms, labored breathing, piloerection, cataracts, rectal prolapse, impaired balance, or paralysis
- Therapy-induced toxicity could occur. Signs include lethargy, lack of grooming, loss of activity and tremors.

Explain why these effects may emerge.

- Procedures require handling which may cause stress
- Anaesthetics will result in a state of drowsiness after the procedure, which may have a more pronounced effect on some animals than on others.
- We aim to assess our anti-senescence compounds in aged mice or mice with specific age-related diseases. These mice will therefore have age-related symptoms.
- This is the first instance in which new anti-senescence compounds will be tested *in vivo*. It is therefore possible that unforeseen side effects may occur.

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

- Stress during procedures cannot be avoided, but mice will be handled by experienced and well-trained researchers.
- All procedures will be conducted by well-trained researchers and in accordance with standardized protocols.
- Mice are kept on a heated surface/heating mat during and after imaging. The mice are monitored for at least 10 minutes until fully awake and active.
- Symptoms of aging and disease are monitored using a standardized welfare scoring list. Symptoms can be scored on this list, resulting in a total discomfort score per mouse. The total score determines whether an animal is examined twice weekly, daily, twice daily, or when a humane endpoint is reached, and the mouse is sacrificed.
- Adverse effects of therapeutic interventions are minimized by relating the dose and regimen to the optimal dose and treatment schedule for [REDACTED] determined in previous experiments.

## E. 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 F

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

Aged mice are prone to several health issues that need close monitoring. All clinical symptoms are assessed and scored according to a standardized welfare scoring list (see 2A, procedures). The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. The resulting total score will decide whether a HEP is applied.

Key symptoms are [20-22]:

- Loss of more than 15% of body weight within 2 days or 20% in total compared to baseline or age-matched controls. Alternatively, visible weight loss when overall body weight remains stable: visible ribs and spinal cord.
- Severe loss of activity and lethargy
- Inability to access food or water
- Self-mutilation, piloerection, grimace indicating pain
- Severe muscle spasms
- Frailty: reduced movement, hunched posture, limping, stiff joints
- Tumor formation: palpable tumors or enlarged abdomen
- Cognitive decline and neurological problems: disorientation, tremors, uncoordinated movements
- Cardiovascular and respiratory issues: labored breathing, chronically choked breathing, lethargy
- Kidney dysfunction: excessive urination, dehydration
- Skin problems: alopecia, lesions
- Gastrointestinal issues: diarrhea, constipation
- Cataracts or eye discharge
- Rectal/vaginal/uterine/penile prolapse
- Specifically for the TDP43 mutant mice: functional paralysis of both hindlimbs.

Treatment may cause acute and long-term toxicity:

- Acute symptoms include loss of activity, isolation, and tremors. When these signs are not resolved within 2 hours a HEP is reached.
- Long term symptoms include weight loss, lethargy, ruffled fur, hunched posture, and labored breathing. These symptoms are included in the welfare scoring list.

When abnormal behaviour is detected, a veterinarian can be consulted to assess whether the discomfort is too severe and euthanasia is required.

Indicate the likely incidence.

In experiments where the overall survival is determined, mice will be sacrificed when humane endpoints are reached. This will be approximately 25% of all experiments. In experiments where mice are sacrificed at a predetermined time point, the likely incidence that humane endpoints are reached are low, since the goal of these experiments is to assess treatment outcome at an earlier time point. However, unforeseen complications may arise, which we predict will be in max 10%.

## F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Cumulative discomfort per model and procedure (for frequency, see at A: animal procedures)

	Maximum discomfort due to disease	Procedures (not all performed on the same day!)	Cumulative discomfort procedures	Cumulative discomfort experiments
Natural aging	Moderate[23]	Mobility scoring, Hind-limb clasping test, Gait and coordination analysis, Strength scoring, Blood collection	Mild/moderate (depending on age or disease state)	Moderate
		Echocardiography	Mild/moderate (depending on age or disease state)	
		Imaging	Moderate	
		Therapeutic intervention	Mild/moderate (depending on age or disease state)	

Accelerated aging	Moderate [2]	Mobility scoring, Gait and coordination analysis, Strength scoring, Blood collection	Mild/moderate (depending on age or disease state)	Moderate
		Imaging	Moderate	
		Therapeutic intervention	Mild/moderate (depending on age/disease state)	
Disease specific model (e.g. Alzheimer's Disease)	Moderate [4, 19]]	Mobility scoring, Hind-limb clasping test, Gait and coordination analysis, Strength scoring, Blood collection	mild/moderate (depending on disease state)	Moderate
		Imaging	Moderate	
		Rotarod, Barnes test, open field test, or echocardiography	Mild/moderate (depending on disease state)	
		Therapeutic intervention	Mild/moderate (depending on disease state)	
ALS model where paralysis is an endpoint	Severe [24]	Mobility scoring, Hind-limb clasping test, Gait and coordination analysis, Strength scoring, Blood collection	Mild/moderate (depending on disease state)	Severe
		Imaging	Moderate	
		Rotarod	Mild/moderate (depending on disease state)	
		Therapeutic intervention	Mild/moderate (depending on disease state)	

- We classify the aging phenotype and most age-related diseases as moderate discomfort, due to the coexistence of multiple clinical symptoms. Procedures will be performed on these mice, but these are not expected to raise the discomfort level to "severe", except in unforeseen cases. Therefore 5% severe is included.
- The discomfort of ALS models where paralysis is a humane endpoint, can be "severe" discomfort due to the disease itself. Paralysis is what ultimately kills ALS patients and therefore we want to test such a model to see if we can prevent paralysis with a new compound. We will euthanize a mouse if paralysis occurs, to prevent severe discomfort. Limb paralysis will be preceded by progressively worsening motor deficits, allowing us to anticipate its onset. However, there is a possibility that paralysis may develop before we have the opportunity to intervene, so we account for 20% severe cases in this estimation.
- Injections, blood withdrawal, imaging, health and behavioural tests: mild in a healthy mouse, moderate when performed on mice of advanced age or mice with advanced disease symptoms.
- Imaging is considered moderate when repeated, due to repeated narcosis.
- Unexpected therapy-induced toxicity: moderate
- In overall survival experiments, it can be more difficult to assess discomfort, and in rare cases mice may spontaneously succumb to disease symptoms (even with intensive welfare scoring), which is then scored as "severe". We strive to prevent this, but it remains a possibility. As such, we have included 10% "severe".

Cumulative discomfort per type of experiment:

- Experiments where the mice are sacrificed at a predetermined timepoint (maximum 2720 mice): Moderate in 95%, severe in 5%
- Experiments where overall survival is the primary outcome parameter (maximum 2800 mice): Moderate in 90%, severe in 10%
- Experiments in one model of ALS with paralysis as a HEP: Moderate in 80%, Severe in 20%. Only overall survival experiments are expected to cause severe discomfort, a maximum of 8 compounds can be tested, 2 groups (ctrl vs treatment) of max 25 mice (see B: the animals; number) = 20% severe of 400 mice

Moderate: 95% of 2720 mice + 90% of 2800 mice + 80% of 400 = 5424. 5424/5920 = 92%

Severe: 5% of 2720 mice + 10% of 2800 mice + 20% of 400 = 496. 496/5920 = 8%

### G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>Senescence subtypes and degrees of stemness are characterized in <i>in vitro</i> in 2D cell cultures and 3D multicellular structures (already largely running in our lab), and suitable biomarkers identified. Novel anti-senescence compounds are first tested in these systems, to establish their potency and their expected effect on tissues.</p> <p>Age-related diseases are complex and cannot be fully replicated in tissue culture models. Furthermore, we want to test the effect of the novel compounds on key clinical symptoms of aging, such as frailty and cognitive decline, and these can only be accurately assessed in a living organism. In addition, <i>in vivo</i> studies provide insight into long-term outcomes and the interactions between different tissues and organs, which are crucial for evaluating the therapeutic impact of new treatments. Therefore, the mice cannot completely be replaced.</p>
Reduction	<ul style="list-style-type: none"><li>- The number of animals used in full scale experiments is reduced by the selection of reliable models that show limited variation. This is achieved by assessing the presence of senescence (subtypes) and degrees of stemness in available post-mortem tissues or by an extensive literature review.</li><li>- Only compounds that show sufficient selectivity against senescent cells/redifferentiation over healthy cells will be tested in mice.</li><li>- Prior to conducting further experiments, it is essential to determine the <i>in vivo</i> potential of our compounds against senescence (subtypes), dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism. This will be accomplished through the execution of a single experiment, which will subsequently inform the decision regarding whether to pursue testing of additional models.</li><li>- When possible, senescence levels will be determined longitudinally (e.g., through bioluminescence imaging), decreasing the number of independent groups that need to be compared.</li></ul>
Refinement	<ul style="list-style-type: none"><li>- Appropriate anesthesia is applied during procedures.</li><li>- We have established elaborate and standardized welfare scoring lists to assess age-related symptoms and discomfort during the experiments and to reduce the risks of unforeseen discomfort/incidence of spontaneous death occurring in cooperation with the care taking staff.</li></ul>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

[Click or tap here to enter text.](#)

### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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.

Click or tap here to enter text.

### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

N/A

### J. 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 K.

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.

Click or tap here to enter text.

## 3. End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Click or tap here to enter text.

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

We will analyze their organs for morphology, and the presence of senescent cells.

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.

Click or tap here to enter text.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

#### Cervical dislocation

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Click or tap here to enter text.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Click or tap here to enter text.

1. [REDACTED]
2. Krishnan, V., et al., *Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(30): p. 12325-12330.
3. Vieira de Sa, R., et al., *ATAXIN-2 intermediate-length polyglutamine expansions elicit ALS-associated metabolic and immune phenotypes*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 7484.
4. Hulshof, L.A., et al., *Both male and female APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> mice are impaired in spatial memory and cognitive flexibility at 9 months of age*. Neurobiology of Aging, 2022. **113**: p. 28-38.
5. Lee, J.D., et al., *Absence of Receptor for Advanced Glycation End Product (RAGE) Reduces Inflammation and Extends Survival in the hSOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Mol Neurobiol, 2020. **57**(10): p. 4143-4155.

6. Zhao, J., et al., *Decreased signalling of EphA4 improves functional performance and motor neuron survival in the SOD1(G93A) ALS mouse model*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 11393.
7. Guyenet, S.J., et al., *A Simple Composite Phenotype Scoring System for Evaluating Mouse Models of Cerebellar Ataxia*. Vol. 39. 2010: 1940-087X. e1787.
8. Prut, L., et al., *Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze*. *Behav Brain Res*, 2007. **179**(1): p. 107-10.
9. Bach, M.E., et al., *Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(9): p. 5280-5.
10. Workman, P., et al., *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(11): p. 1555-77.
11. Diehl, K.H., et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. *J Appl Toxicol*, 2001. **21**(1): p. 15-23.
12. Kim, S.R., et al., *Increased renal cellular senescence in murine high-fat diet: effect of the senolytic drug quercetin*. *Transl Res*, 2019. **213**: p. 112-123.
13. Xu, M., et al., *Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age*. *Nature Medicine*, 2018. **24**(8): p. 1246-+.
14. Amengual, J., et al., *Iron chelation as a new therapeutic approach to prevent senescence and liver fibrosis progression*. *Cell Death Dis*, 2024. **15**(9): p. 680.
15. [REDACTED]
16. Baker, D.J., et al., *Naturally occurring p16<sup>-positive</sup> cells shorten healthy lifespan*. *Nature*, 2016. **530**(7589): p. 184-+.
17. Feneberg, E., et al., *The interactome of human TDP-43 in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis*. *European Journal of Neurology*, 2019. **26**: p. 221-222.
18. van den Heuvel, D.M., et al., *Taking a risk: a therapeutic focus on ataxin-2 in amyotrophic lateral sclerosis?* *Trends Mol Med*, 2014. **20**(1): p. 25-35.
19. Garcia-Alloza, M., et al., *Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease*. *Neurobiology of Disease*, 2006. **24**(3): p. 516-524.
20. Pettan-Brewer, C. and P.M. Treuting, *Practical pathology of aging mice*. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 2011. **1**.
21. university, M. *SOP-Humane Intervention Points For Aging Mice And Rats* Available from: [https://www.mcgill.ca/research/files/research/412-humane\\_intervention\\_points\\_for\\_aging\\_rodents.pdf](https://www.mcgill.ca/research/files/research/412-humane_intervention_points_for_aging_rodents.pdf).
22. Ray, M.A., et al., *Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2010. **49**(3): p. 282-8.
23. Toth, L.A., *Identifying and Implementing Endpoints for Geriatric Mice*. *Comp Med*, 2018. **68**(6): p. 439-451.
24. Philips, T. and J.D. Rothstein, *Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2015. **69**: p. 5 67 1-5 67 21.



## 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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure  <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	Analysis of novel compounds in senescence-induction models

### 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.

This appendix describes the evaluation of novel compounds in mouse models of age-related diseases, in models where senescent cells or general aging features are actively induced. Primary outcome parameters are senescence levels, stemness levels, organ function, frailty indicators, and glucose tolerance.

As described in the project proposal, the entire project consists of four phases:

- In **Phase 1** Senescent cells, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism, are characterized and novel compounds are evaluated *in vitro*
- In **Phase 2** Mouse models are evaluated for the presence of (a subtype of) senescent cells, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism
- In **Phase 3** Using validated mouse models, the potency of novel compounds to improve health span will be evaluated.
- In **Phase 4** the novel compounds are prepared for clinical translation

In previous experiments (CCD license AVD1150020199125, [1]), we have shown [redacted] to reduce the number of senescent cells, reduce inflammation levels, and improve organ function after inducing senescence in the liver by treatment with doxorubicin or CCl4. The aim of this project is to further evaluate the potential of our lead compound [redacted] and two next-generation [redacted] in models where senescence

is induced in a controlled manner. Furthermore, we aim to assess the efficacy of a maximum of five novel anti-senescence compounds against specific subtypes of senescence.

Examples of relevant models in which the effect of subtypes of senescent cells and the effect of novel compounds can be assessed:

- **Damage-induced senescence:** Senescence can be induced by chemotherapeutics such as Doxorubicin, which, while potent anti-cancer drugs, also cause significant off-target toxicity by inducing senescence in organs such as the heart, liver, and kidneys [2, 3]. The presence of senescence in these organs is consistent with what is observed in human aging, which decreases organ function and elevates the risk of cancer progression[4]. This model is easy to implement, and both our own work and other studies have shown that senescent cell removal effectively counteracts these harmful effects [5]. Additionally, we will investigate local damage-induced senescence to assess organ-specific impacts, e.g. using bleomycin to induce senescence in the lung or CCl4 to induce senescence specifically in the liver[6, 7].
- **Senescent cell engraftment:** Senescent cells can be engrafted into specific tissues to model local senescence and its detrimental effects. Senescence is induced in primary mouse cells *ex vivo* by damage or oncogene-activation. No additional mice will be sacrificed for these experiments, since we will use primary cells already available in our lab. This model allows us to examine localized tissue damage and effects on stemness and may also provide insight into whether engrafted senescent cells lead to systemic effects beyond the engraftment site [8].
- **A high-fat/high-sucrose diet:** This diet induces metabolic dysregulation and is also known to induce senescence in several tissues, particularly in adipose tissue, liver, and pancreas [9]. This model will allow us to study metabolic dysfunction and assess how novel compounds can mitigate diet-induced health issues, such as insulin resistance and inflammation.

Which model will be employed depends on the *in vitro* studies in **Phase 1**, where senescence subtypes are characterized, and suitable biomarkers identified. In **Phase 2**, pilot experiments will be conducted to determine senescence (subtype) levels after damage or to establish a successful engraftment of senescent cells.

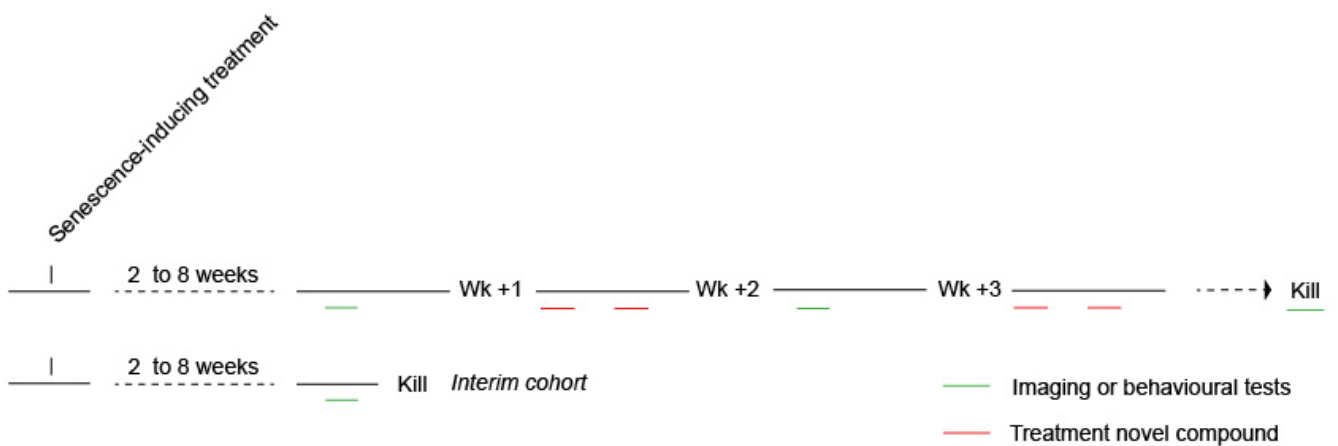
The general setup of the proposed experiments will look like the following:

- 1) Induce senescence in the organ of interest or systemically.
- 2) Analysis:
  - a) Behavior and health parameters are measured by collecting urine and feces, performing basic functional assays and drawing of peripheral blood (See below for procedures and an assessment of discomfort). These analyses include short filming of behavior, taking pictures to assess physique, analysis of grip strength and gait, temperature measurement (external non-invasive thermometer), and weighing. In parallel, passive collection of urine and feces and collection of peripheral blood. In addition, the motor function of ALS mice will be assessed by Rotarod, and the AD mice will be assessed for cognitive function by employing the Barnes test and open field test.
  - b) Imaging techniques are applied on a separate subset of mice to detect senescence or age-related symptoms. From experience, we know that imaging and functional biology are best not to happen in the same animal as they influence one another, hence the division in cohorts used for imaging, and cohorts used for functional analyses. Imaging techniques include bioluminescence imaging or Fluorescence Molecular Tomography (FMT) to assess the development of (subtypes of) senescence over time, and CT scans for bone curvature, muscle mass and tissue volume/function (<90min; under anesthesia). Where possible, these techniques are applied in the same run to minimize discomfort.
- 3) Treat the mice with anti-senescence compounds or a control (PBS, NaCl, or a control compound)
- 4) Repeat (2)
- 5) The mice will be sacrificed either when their HEP is reached for overall survival experiments or at the same time when outcome parameters include senescence levels, age-related symptoms, or organ morphology.
- 6) In all experiments, tissue samples are obtained to study organ morphology, and the presence of biomarkers for compound sensitivity.

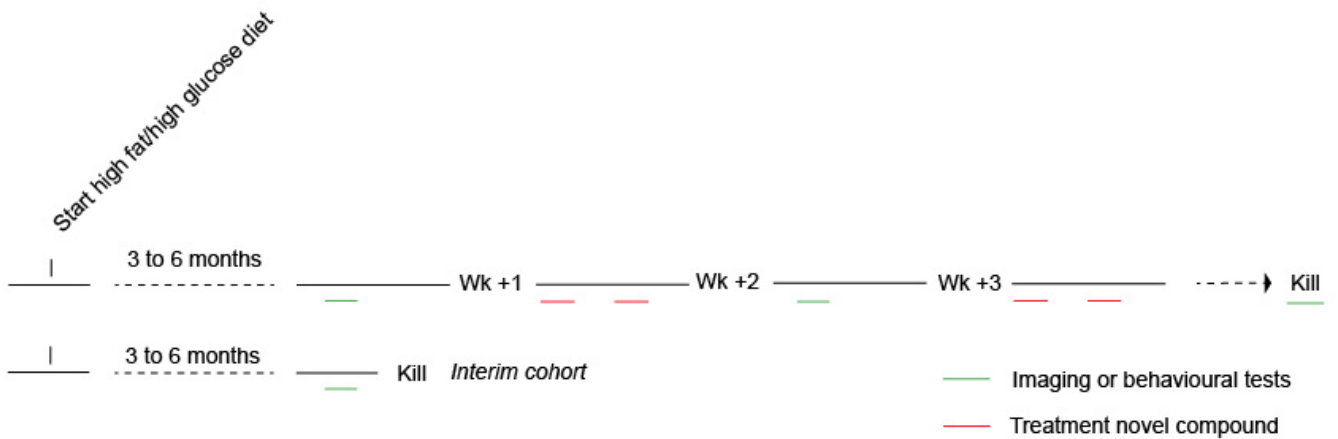
In some experiments, tissues will be collected from interim cohorts to study the levels of senescence, the levels of the target protein, and organ morphology at a specific time point. Such a cohort could be killed after damage, or after (several rounds of) treatment (maximum of two interim cohorts per experiment). We will add these groups when, for example, we want to confirm the induction of senescence after a specific damage or correlate specific disease symptoms at a particular time point with senescence levels in a particular tissue. In addition, interim cohorts could provide valuable information on how long it takes to eliminate senescent cells or how long it takes for tissue to regenerate after treatment.

Examples of typical experimental timelines:

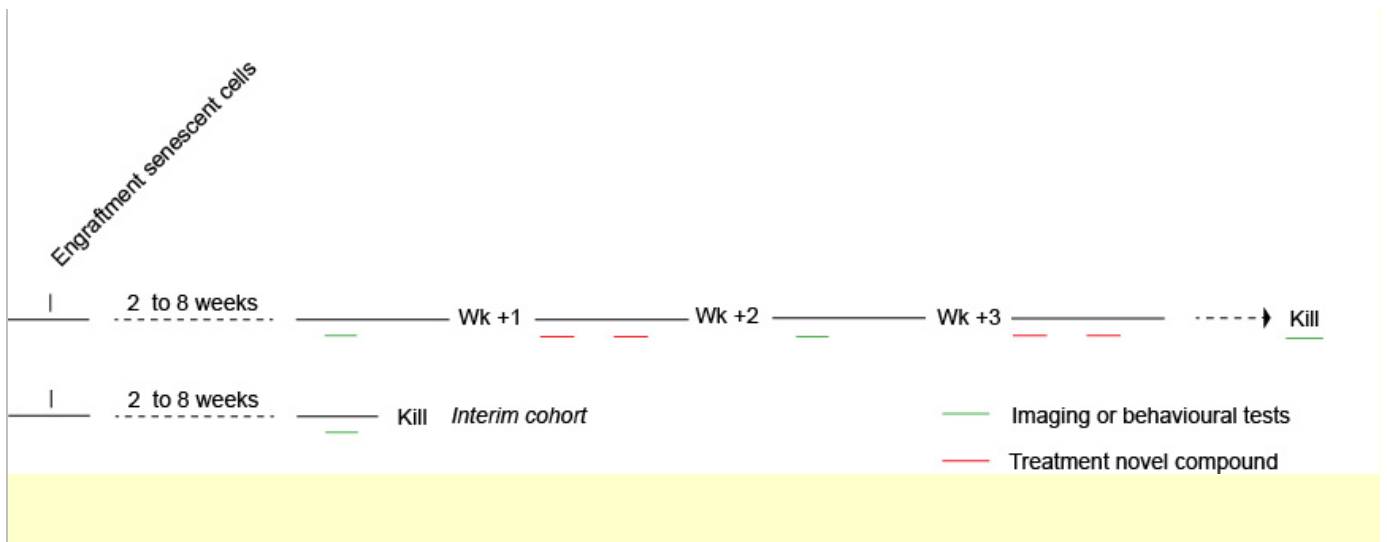
*Studying the effect of novel compounds on damage-induced senescence*



*Studying the effect of novel compounds on diet-induced senescence*



*Studying the effect of engrafted senescent cells and of novel compounds targeting these cells*



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

#### Damage induction

- To induce senescence by systemic damage, C57BL/6J mice are treated with DNA damaging chemotherapeutics, such as doxorubicin or paclitaxel, i.p. 1 to 3 times [4, 5].
- Liver senescence is induced through CCl<sub>4</sub> treatment, injected intraperitoneally twice a week for 4–8 weeks [7]
- Lung senescence is induced in mice by i.v. injections of bleomycin[6, 10]

#### High fat/High glucose diet

C57BL/6 mice are fed a diet of 60 kcal% fat, 20 kcal% carbohydrate and 20 kcal% protein[9, 11] for 3 to 6 months.

#### Transplantation of senescent cells

NOD-SCID mice are anesthetized using isoflurane and senescent cells are subsequently injected. The method depends on the cell type engrafted:

- Senescent stromal cells are injected intraperitoneally [8]
- To implant senescent hepatocytes, a small incision is made in the upper abdominal wall and cells are injected into a branch of the mesenteric veins [12]. We aim to refine this method, i.e. by injecting under ultrasound guidance. This eliminates the need for laparotomy and greatly reduces discomfort. To this end, extra mice for training and refinement of this technique will be added to this appendix.

#### Collection of urine, feces, and peripheral blood.

Urine, feces, and peripheral blood will be collected at the beginning of an experiment, an intermediate point (e.g. before start of treatment), and before sacrifice. Blood will be collected from an appropriate site with a max volume 100ul [13]. Urine and feces will be collected by placing the mouse on parafilm. At least 50ul Urine and one solid piece of feces will be collected. This is done within reason and should not lead to moderate discomfort. Repeat after 24hrs if unsuccessful. **This procedure is performed in all models, max four times over the whole experiment (max once a week).**

#### Health and behavioral tests

Basic health and strength tests are performed at most once a week. These can be combined as they are quick and non-invasive.

#### Mobility scoring

The mice are individually placed in an empty cage or in a video tracking system (e.g. EthoVision) , without bedding or food. The mice are allowed to explore for 30s while a video is made. Their mobility will be scored using tracking software. **This test is performed for all models, max once a week.**

#### *Hind-limb clasping test*

In the hind-limb clasping test, mice are suspended by their tail and filmed for 30 seconds against a white background. During this time, a score is assigned between 1 and 4, depending on how long one or both hindlimbs are retracted towards the abdomen. This test is used to assess motor function and neuromuscular health in the mice, and can be performed in all experiments, except in experiments where mice received a special diet. **The test will be performed in the senescence implantation model, max once every two weeks.**

#### *Gait and coordination analysis*

The front and back paws of a mouse are painted with nontoxic red and blue paint, respectively, using a tissue. The mouse is placed on a piece of white paper with a shelter at the opposite end and encouraged to walk towards the shelter. This process is repeated two more times. The distance between the center of each paw print and the next is measured, as is the straight-line distance from the back paw to the adjacent front paw. The first and last paw prints are excluded from the analysis to ensure accuracy.

After the walking test, an additional assessment of the mice's motor coordination and balance is conducted. The animals, with their paws still painted, are gently held upside down at a height of 30 cm above a soft surface, then released. The mice will naturally land on their feet, and the imprint of their paws upon landing provides an indication of their motor function and balance.

Alternatively, a CatWalk system can be used (when available) to assess gait and coordination automatically. Here, a mouse is allowed to walk over a glass walkway, where its paw prints are captured by a camera and analyzed.

**These tests are performed with all mouse models, max once a week.**

#### *Strength scoring*

Grip strength will be used to assess both forelimb and hindlimb strength using two distinct tests. First, mice will be placed on a BioSeb grip strength tester, and the force exerted by all four limbs will be measured. Each mouse will be tested five times, and the highest value will be taken as its grip strength. These values will be normalized to the mouse's weight. In the second test, the mice will be gently lifted by the tail and encouraged to grip sponges with wires attached, each with different weights. If a mouse can hold on for 3 seconds, it progresses to the next weight. If it holds for only 1-3 seconds, it is given another attempt. If the mouse fails again, the last successful weight is recorded. These tests will provide valuable insights into motor deficits and muscle strength in the mice.

**These tests can be performed in all experiments, except in experiments where mice received a special diet. The test will be performed max once every week.**

#### *Echocardiography*

Before performing echocardiography on conscious mice, they are trained over two to three sessions across three days. Prior to imaging, the chest hair is shaved, and pre-warmed ultrasound gel is applied. A small ultrasound probe is used to capture real-time images of the heart's structure and function. Key measurements include ventricular size, wall thickness, and ejection fraction. **This test can be performed on all mice, max every two weeks.**

#### *Glucose tolerance test*

The mice are fasted for 6 hrs in the morning, before a topical anesthetic cream is added to the tail of the mouse and a small drop of blood (<5µl) is obtained from the tip of the tail for a baseline glucose measurement [14]. The first drop of blood is discarded and the measurement is repeated 3 times. Mice are not restrained, to

prevent stress. Subsequently, 2g of glucose/kg is injected i.p. and glucose levels are measured 15, 30, 60 and 120 minutes after. The bleeding is started again by removing the clot from the first incision and slightly massaging the tail. Further blood loss from the incision is prevented by briefly applying pressure to the incision. **This test is only performed max once a week, in experiments where a special diet is given to the mice.**

All health and behavioural tests cause mild discomfort. To avoid greater discomfort, not all tests are performed on the same animal on the same day:

- The strength scoring tests are done on one day [15], [16].
- mobility scoring, the hind limb clasping test, and gait and coordination analysis are done on another day[17].
- Tests that require more time, such as the echocardiography or the glucose tolerance test, are performed on a different day.

### Imaging

Imaging techniques are employed to determine senescence levels or specific age-related symptoms at the start of an experiment, and to determine the effects of the administered intervention. To avoid undue stress on the animals, this procedure is performed no more than once a week[18]. In long experiments (>6 months), we will image maximum once a month. As mentioned above, imaging techniques are applied to a separate subset of mice from those used for behavioral analysis. In addition, only one imaging technique is used per experiment, unless mice can be kept under anesthesia for two imaging techniques, and this **does not exceed 2 hours**.

The mice will be anesthetized during imaging using isoflurane. When mice need to be unconscious longer than 10 minutes, their temperature will be controlled using heating mats and lamps, and breathing will be monitored. Imaging will usually take 5 to 10 minutes and will never exceed 2hrs [18]. A substrate or tracer (see explanation below) is injected when applicable prior to imaging. Subsequently, the animals are anaesthetized, the abdomen is shaved, and imaging is performed.

The imaging techniques we will include:

- Bioluminescence imaging using the BioSpace Imager. This method detects light produced by a luciferase reporter construct. To generate the bioluminescence signal, luciferase oxidizes the substrate luciferin, which is injected into the mice prior to imaging. A general luciferase reporter can be used to label transplanted cells, allowing them to be tracked throughout the experiment. Alternatively, a luciferase reporter can be specifically tailored to detect senescent subtypes by placing a relevant senescence-associated gene promoter, such as p16<sup>INK4a</sup>, upstream of the luciferase gene. This approach allows the precise detection of senescent cells expressing specific biomarkers, providing valuable insights into the localization and dynamics of senescence in tissues.
- FMT to detect fluorescence. This technique has a higher resolution than bioluminescence imaging and can therefore be applied to study senescence (subtypes) in specific areas.
- CT scans are made to assess bone curvature, muscle mass and tissue volume/function. A contrast enhancer may be injected into the bloodstream to enhance the visibility of specific organs.

### Therapeutic intervention

Treatment is started either before the onset of symptoms to assess the ability of a novel compound to prevent them, or after the emergence of symptoms to assess reversal. The novel compounds will be administered via subcutaneous injection, intravenous injection, intraperitoneal injection, or via oral gavage with max volumes according to Diehl et al [13].

Our lead compound [REDACTED] will be mostly administered twice per week intravenously. This is based on previous experiments in which the optimal dose and frequency were determined. Similarly, novel compounds will also be administered twice per week, unless there is *in vitro* evidence to suggest otherwise. Treatments will be administered a maximum of twice per day.

Treatments will not take place on the same day as imaging or behavioral tests.

Maximum frequency of procedure per type of experiment (For discomfort scores, see F: Classification of severity of procedures)

Experiment:	Duration of discomfort	Max. frequency	Max. number in one experiment
Damage-induced senescence			
Damage induction	Entire experiment due to systemic senescence	Once/day	3
Collection of urine, feces, and blood	10 min	Once/week	4
Health and behavioural tests	30 min	Once/week	12
Imaging	24hrs (narcosis)	Once/week	12
Therapeutic intervention	10 min	Depends on the treatment, max twice a day	28
Diet-induced senescence			
Diet	Entire experiment due to obesity	Entire experiment	Entire experiment
Collection of urine, feces, and blood	10 min	Once/week	4
Health and behavioural tests	30 min	Once/month	12
Glucose tolerance test	3hrs	Once/week	12
Imaging	24hrs (narcosis)	Once/month	12
Therapeutic intervention	10 min	Depends on the treatment, max twice a day	28
Senescent cell engraftment			
Engraftment i.p.	Entire experiment due to local senescence	Once	1
Engraftment in the liver	48 hours (surgery); Entire experiment due to local senescence	Once	1
Collection of urine, feces, and blood	10 min	Once/week	4
Health and behavioural tests	30 min	Once/week	12
Narcosis for imaging	24hrs (narcosis)	Once/week	12
Therapeutic intervention	10 min	Depends on the treatment, max once a day	28

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

The number of animals will be minimized by:

- Testing novel compounds extensively *in vitro*. Compounds will only be tested in mice when they show sufficient potency against senescent vs healthy cells (Go-/no-go point 1).
- Performing pilot experiments. Only mouse models exhibiting sufficient levels of senescence will be employed to ensure a sufficiently large window of measurement for the effects, thereby reducing the number of mice required (Go-/no-go point 2).
- Performance of a statistical power analysis to determine the mice needed for full experiments. Here, we will use the Sigma and Delta based on based on literature, or the senescence levels we detected in the above-mentioned pilot experiment(s) (for Sigma). We will use GPower software to calculate group sizes, using a one-tailed t-test, since we expect a beneficial effect of treatment and will be comparing 2 groups. The primary outcome parameter of interest and the variation observed in the pilot experiment will determine the input values. We will only proceed with experimental designs that use a maximum of 10 mice per group, as the literature shows significant results in several models of interest with less than 10 mice per group [5, 7, 8, 19]. These numbers include attrition of mice due to unexpected experimental

complications. In general, the attrition rate is expected to be no more than 10%. A statistician is consulted with every work protocol.

- To detect senescence, longitudinal imaging is used whenever possible, thus reducing the need for separate cohorts.
- When possible: testing of multiple novel compounds in parallel, since this reduces the amount of control groups necessary

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mus musculus	Commercial breeder	6 weeks-52 weeks	5080 in total	Male and Female	No	C57BL/6
2	Mus musculus	Commercial breeder	6 weeks to 26 weeks		Male and Female	Yes, immunocompromised	NOD/SCID

Provide justifications for these choices

Species	Mice are employed in this study since senescence models in mice have been well-established. Moreover, they are straightforward to care for, image, and accommodate larger group sizes.
Origin	It is more cost-effective to purchase mice from an authorized commercial breeder
Life stages	To reduce variation, the experiment will start with mice aged between six and 12 weeks. It takes months for a high-fat diet to induce senescence, so the mice in these experiments may live up to a year.
Number	<p>Because we make use of go-/no-go moments, we will only proceed with compounds that are promising, i.e. which pass the in vitro stages in go-/no-go moment 1 (phase 1 of the project). When entering the in vivo part of this project, we thus envision the following numbers:</p> <p><u>Phase 2 (until go-/no-go moment 2): max 60</u>            In this phase, pilot experiments will be performed to evaluate:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Senescence induction after damage. We envision testing 5 distinct damaging agents. The damaging agent is selected based on what subtype of senescence it induces <i>in vitro</i> and whether we developed a compound against this subtype.</li> <li>- The take rate of engrafted senescent cells. Distinct subtypes of senescent cells will be likely engrafted in the liver or adipose tissue, but could be engrafted in other appropriate tissues. The implantation site depends on the subtype and on in vitro experiments. We envision testing 5 types of senescent cells in this phase in 2 distinct locations = 10 pilot experiments. The types of senescent cells that will be engrafted depends on whether they are predicted to be detrimental for their environment (based on our <i>in vitro</i> experiments) and/or we have developed compounds against the engrafted subtype.</li> <li>- We will not perform pilot experiments for senescence inducers we have used <i>in vivo</i> before (e.g., doxorubicin [5]) or for established methods, such as high fat diet [20, 21].</li> </ul> <p>Based on experience, 4 mice per group will be used for these pilot experiments. =15*4=60 mice</p> <p><u>Phase 3a (until go-/no-go moment 3): max 160</u>            Based on phase 2 we will calculate group sizes needed to reach significant conclusions (see A, statistical methods), i.e. a 20% reduction in senescent cells or 20% improvement in health parameters (as described in the project proposal). We anticipate group sizes to remain equal or lower than 10 per group.</p>

As described in the project proposal, we will first test:

- ██████ in a model we did not test before. This requires two groups of max 10 mice: one control and one ██████ group (=20 total)
- Two additional ██████ and a maximum of 5 novel compounds in one model (with the respective control groups), this requires 14 groups (7 control and 7 treatment) of max 10 mice (=140 total).

Phase 3b (until go-/no-go moment 4): max 4800

If the initial experiments are successful, a compound can be tested across multiple models, with a maximum of five models. Each model can be used for two readouts: imaging or behavioral/symptom analysis (two separate experiments). This means 8 compounds \* 5 models \* 2 readouts \* 2 groups (control and treatment) \* 10 mice per group= 1600 mice maximum (see table).

Furthermore, up to two extra timepoints of killing can be included per experiment (resulting in four additional experimental groups: 2 control, 2 treatment). This means 4 groups \* 5 models \* 2 readouts \* 8 compounds\* 10 mice =3200 mice maximum (see table)

Phase	Experiment	Mice per group	Model	Read-outs	Experimental groups	Compounds	Max # mice
1	In vitro	-		-	-	-	0
2	Model characterization	4	15	1	1	-	60
3a	██████	10	1	1	2	1	20
3a	██████	10	1	1	2	2	40
3a	Novel anti-senescence compound	10	1	1	2	5	100
3b	All compounds	10	5	2	2	8	1600
3b	All compounds (interim groups)	10	5	2	4	8	3200

Total number of mice in experiments=5020

Training (max 60 mice)

Next to the mice in the experiments, we require a number of mice to train all personnel on new techniques (e.g. for refinement). An example of a new technique is the engraftment of senescent cells with ultrasound guidance into the liver, or an alternative technique for picking up the mice (opposed to picking them of by the tail). We envision a maximum of 4 new techniques for 5 trainees. 4 live animals per procedure will also be required here. = 4\*5\*4= 60 mice.

Total number of mice is=5080

3Gender	We strive to use both genders in order to exclude any potential sex-specific effects
Genetic alterations	Immunocompromised mice will be employed when human senescent cells are engrafted.
Strain	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) C57BL/6 mice are mainly used in literature to study senescence</li> <li>2) For experiments where senescent cells are engrafted, immunocompromised mice are necessary if the cells are human. In this case, NOD/SCID mice are most commonly used.</li> </ol>

**C. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

Click or tap here to enter text.

#### **D. Pain and compromised animal welfare**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Click or tap here to enter text.

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

Mice will be anesthetized during imaging and during engraftment of senescent cells in the liver. For the latter, the animals receive carprofen 30 min before surgery and the day after for pain relief. In addition, Lidocaine and Bupivacaine are injected s.c. at the site of incision before the start of the procedure. All procedures will be conducted in accordance with standardized protocols, and the animals will be monitored meticulously throughout the procedure and for a period of time afterwards (depending on the severity of the procedure).

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

- Stress during the procedures.
- Consequences of narcosis required for imaging: e.g. lethargy, drop in body temperature, abnormal gait, lack of grooming, weakness. The mice should recover within 1 day after imaging.
- Consequences of surgery and narcosis: e.g. lethargy, abnormal gait, lack of grooming, weakness. The mice should recover within 2 days after surgery.
- Consequences of senescence induction by damage, diet or cell engraftment. For example, lethargy, hunched posture, muscle spasms, labored breathing, piloerection, cataracts, ascites, skin irritation, elephant teeth or rectal prolapse.
- Therapy-induced toxicity could occur. Signs include lethargy, lack of grooming, loss of activity and tremors

Explain why these effects may emerge.

- Anaesthetics will result in a state of drowsiness after the procedure, which may have a more pronounced effect on some animals than on others.
- Complex surgical procedures, such as those requiring a laparotomy, may result in complications including wound reopening, hypothermia, and dehydration.
- We aim to assess our anti-senescence compounds in mice that show senescence in relevant organs. To induce senescence, cellular damage or stress is required.
- This is the first instance in which new anti-senescence compounds will be tested *in vivo*. It is therefore possible that unforeseen side effects may occur.

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

- Stress during procedures cannot be avoided, but mice will be handled by experienced and well-trained researchers.
- All procedures will be conducted by well-trained researchers and in accordance with standardized protocols.
- Mice are kept on a heated surface/heating mat during and after imaging. The mice are monitored for at least 10 minutes until fully awake and active.
- After surgery, the mice are placed on heating mats and monitored for at least 30 min until they are fully awake and active. The day after surgery, the animals are checked again. This is repeated when mice show signs of discomfort.
- Symptoms of disease are monitored using a standardized welfare scoring list. Symptoms can be scored on this list, resulting in a total discomfort score per mouse. The total score determines whether an

animal is examined twice weekly, daily, twice daily, or when a humane endpoint is reached, and the mouse is sacrificed.

- Adverse effects of therapeutic interventions are minimized by relating the dose and regimen to the optimal dose and treatment schedule for [REDACTED] determined in previous experiments.

## E. 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 F

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

The mice are weighed, and health parameters monitored twice a week and scored according to our standardized welfare scoring list. This list was made in accordance with literature and refined based on our own experience.

Key symptoms that are scored:

- Loss of more than 15% of body weight within 2 days or 20% in total compared to baseline or age-matched controls. Alternatively, visible weight loss when overall body weight remains stable: visible ribs and spinal cord.
- Severe loss of activity (lethargy, apathy), loss of ability to eat or drink, hunched posture, muscle spasms, labored or irregular breathing, enlarged abdomen, development of visible or palpable tumors, self-mutilation, piloerection, grimace indicating pain, cataracts or eye discharge, Rectal/vaginal/uterine/penile prolapse, diarrhea [22, 23].
- Model specific symptoms:
  - o Skin irritations, elephant teeth, and rectal prolapse for mice exposed to a high-fat/high-sucrose diet [21, 24].
  - o Damage-induced senescence models exhibit general symptoms such as lethargy, weight loss, and a hunched posture, but they may also present more pronounced or organ-specific symptoms. For example, Bleomycin treatment often leads to significant weight loss and respiratory issues due to lung damage [25], while CCl4 treatment primarily affects the liver, and may lead to ascites [26].
  - o The welfare scoring list is evaluated and refined at the start of an experiment to take these model specific symptoms into account.

The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. This health score determines whether the observation frequency needs to be increased or whether a humane endpoint is reached. When, according to the scoring list a HEP is reached, the mouse is euthanized, and organs are harvested.

Treatment may cause acute and long-term toxicity:

- Acute symptoms include loss of activity, isolation, and tremors. When these signs are not resolved within 2 hours a HEP is reached.
- Long term symptoms include weight loss, lethargy, ruffled fur, hunched posture, and labored breathing.

When abnormal behaviour is detected, a veterinarian can be consulted to assess whether the discomfort is too severe and euthanasia is required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence that humane endpoints are reached are low, since the goal of these experiments is to assess the efficacy of anti-senescence compounds by sacrificing mice at a predetermined timepoint. We do not perform overall survival experiments with these mice, which decreases the risks that mice reach the HEP. However, unforeseen complications may arise, which we predict will be in max 5%.

## F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).  
**Cumulative discomfort per model and procedure (for frequency, see at A: animal procedures)**

	Maximum discomfort due to the model	Procedures (not all performed on the same day!)	Cumulative discomfort procedures	Cumulative discomfort experiment
Damage-induced senescence	Moderate [27, 28]	Mobility scoring, Gait and coordination analysis, Strength scoring, Blood collection	Mild/moderate (depending on disease state)	Moderate
		Echocardiography	Mild/moderate (depending on disease state)	
		Imaging	Moderate	
		Therapeutic intervention	Mild/moderate (depending on disease state)	
Senescent cell engraftment	Moderate for 48 hrs [12]	Mobility scoring, Hind-limb clasp test, Gait and coordination analysis, Strength scoring, Blood collection	Mild	Moderate
		Echocardiography	Mild	
		Imaging	Moderate	
		Therapeutic intervention	Mild	
High-fat/high-sucrose diet	Moderate [20, 29]	Mobility scoring, Gait and coordination analysis, Blood collection, Glucose tolerance test	Mild/moderate (depending on disease state)	Moderate
		Echocardiography	Mild/moderate (depending on disease state)	
		Imaging	Moderate	
		Therapeutic intervention	Mild/moderate (depending on disease state)	

- Engraftment senescent cells: mild when injected i.p. (~50%), moderate when engrafted in the liver (~50%).
- High fat/ High sucrose diet: mild 75%, moderate 25% (if skin irritations, elephant teeth or rectal prolapse occurs [20, 29])
- Procedures will be performed on these mice, but these are not expected to raise the discomfort level to "severe", except in unforeseen cases. Therefore 5% severe is included.
- Injections, blood withdrawal, imaging, health and behavioural tests: mild in a healthy mouse, moderate when performed on mice with advanced disease symptoms.
- Imaging is considered moderate when repeated, due to repeated narcosis.
- Unexpected therapy-induced toxicity: moderate

Cumulative discomfort per type of experiment (assuming equal distribution of mice over experiment type):

- Damage-induced senescence induction: moderate 95%, severe 5% ;  $5020/3=1673.3$  mice
- Diet-induced senescence induction: mild 75%, moderate 20%, severe 5% ;  $5020/3=1673.3$  mice
- Senescent cell engraftment: mild 50%, moderate 45%, severe 5% ;  $5020/3=1673.3$  mice

Mild:  $1673,3*(0.75+0.5) + 60$  training mice= 2152 (= 42%)

Moderate:  $1673,3*(0.95+0.2+0.45) = 2677$  (= 53%)

Severe:  $5020*0.05= 251$

## G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>Senescence subtypes are characterized in <i>in vitro</i> in 2D cell cultures and 3D multicellular structures, and suitable biomarkers identified. Novel anti-senescence compounds are first tested in these systems, to establish their potency and their expected effect on surrounding cells.</p> <p>Age-related pathologies are complex and cannot be fully replicated in tissue culture models. Furthermore, we want to test the effect of the novel compounds on key clinical symptoms of these pathologies that can only be accurately assessed in a living organism. In addition, <i>in vivo</i> studies provide insight into long-term outcomes and the interactions between different tissues and organs, which are crucial for evaluating the therapeutic impact of new treatments. Therefore, the mice cannot completely be replaced.</p>
Reduction	<ul style="list-style-type: none"><li>- The number of animals used in full scale experiments is reduced by the selection of reliable models that show limited variation. This is achieved by performing pilot experiments to assess the presence of senescence (subtypes) after damage or diet, or to assess whether senescent cells were successfully engrafted.</li><li>- Only compounds that show sufficient selectivity against senescent cells over healthy cells will be tested in mice.</li><li>- Prior to conducting further experiments, it is essential to determine the <i>in vivo</i> potential of our compounds against senescence (subtypes). This will be accomplished through the execution of a single experiment, which will subsequently inform the decision regarding whether to pursue testing of additional models.</li><li>- When possible, senescence levels will be determined longitudinally (e.g. through bioluminescence imaging), decreasing the number of independent groups that need to be compared.</li></ul>
Refinement	<ul style="list-style-type: none"><li>- Appropriate anesthesia and analgesia is applied during procedures.</li><li>- We will not perform overall survival experiments on this appendix to reduce the chance of severe discomfort.</li><li>- We have established elaborate and standardized welfare scoring lists to assess age-related symptoms and discomfort during the experiments and to reduce the incidence of spontaneous death occurring in cooperation with the care taking staff.</li></ul>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

[Click or tap here to enter text.](#)

## H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

## I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

N/A

### J. 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 K.

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.

Click or tap here to enter text.

## 3. End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Click or tap here to enter text.

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

We will analyze their organs for morphology, and the presence of senescent cells.

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.

Click or tap here to enter text.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Cervical dislocation

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Click or tap here to enter text.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Click or tap here to enter text.

1. [REDACTED]
2. Sun, T., et al., *Characterization of cellular senescence in doxorubicin-induced aging mice*. *Exp Gerontol*, 2022. **163**: p. 111800.
3. Linders, A.N., et al., *A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging*. *NPJ Aging*, 2024. **10**(1): p. 9.
4. Demaria, M., et al., *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(2): p. 165-176.
5. [REDACTED]
6. Chen, F., et al., *Bleomycin induces senescence and repression of DNA repair via downregulation of Rad51*. *Mol Med*, 2024. **30**(1): p. 54.
7. Amengual, J., et al., *Iron chelation as a new therapeutic approach to prevent senescence and liver fibrosis progression*. *Cell Death Dis*, 2024. **15**(9): p. 680.
8. Xu, M., et al., *Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age*. *Nature Medicine*, 2018. **24**(8): p. 1246-+.
9. Moustakas, II, et al., *Hepatic Senescence Accompanies the Development of NAFLD in Non-Aged Mice Independently of Obesity*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(7).

10. Moore, B.B. and C.M. Hogaboam, *Murine models of pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(2): p. L152-60.
11. Wang, L., et al., *Targeting p21(Cip1) highly expressing cells in adipose tissue alleviates insulin resistance in obesity*. Cell Metab, 2022. **34**(1): p. 186.
12. Marongiu, F., et al., *Clearance of senescent hepatocytes in a neoplastic-prone microenvironment delays the emergence of hepatocellular carcinoma*. Aging-U.S., 2014. **6**(1): p. 26-34.
13. Diehl, K.H., et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. J Appl Toxicol, 2001. **21**(1): p. 15-23.
14. Pedro, P.F., A. Tsakmaki, and G.A. Bewick, *The Glucose Tolerance Test in Mice*. Methods Mol Biol, 2020. **2128**: p. 207-216.
15. Lee, J.D., et al., *Absence of Receptor for Advanced Glycation End Product (RAGE) Reduces Inflammation and Extends Survival in the hSOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Mol Neurobiol, 2020. **57**(10): p. 4143-4155.
16. Zhao, J., et al., *Decreased signalling of EphA4 improves functional performance and motor neuron survival in the SOD1(G93A) ALS mouse model*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 11393.
17. Guyenet, S.J., et al., *A Simple Composite Phenotype Scoring System for Evaluating Mouse Models of Cerebellar Ataxia*. Vol. 39. 2010: 1940-087X. e1787.
18. Workman, P., et al., *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research*. Br J Cancer, 2010. **102**(11): p. 1555-77.
19. Kim, S.R., et al., *Increased renal cellular senescence in murine high-fat diet: effect of the senolytic drug quercetin*. Transl Res, 2019. **213**: p. 112-123.
20. Liang, H.J., et al., *A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice*. Experimental Animals, 2021. **70**(1): p. 73-83.
21. Shi, Z., et al., *Short-Term Exposure to a Western Diet Induces Psoriasiform Dermatitis by Promoting Accumulation of IL-17A-Producing gamma delta T Cells*. J Invest Dermatol, 2020. **140**(9): p. 1815-1823.
22. Pettan-Brewer, C. and P.M. Treuting, *Practical pathology of aging mice*. Pathobiol Aging Age Relat Dis, 2011. **1**.
23. university, M. *SOP-Humane Intervention Points For Aging Mice And Rats* Available from: [https://www.mcgill.ca/research/files/research/412-humane\\_intervention\\_points\\_for\\_aging\\_rodents.pdf](https://www.mcgill.ca/research/files/research/412-humane_intervention_points_for_aging_rodents.pdf).
24. NC3Rs. Available from: <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/malocclusion-mice>.
25. Cowley, P.M., C.R. Roberts, and A.J. Baker, *Monitoring the Health Status of Mice with Bleomycin-induced Lung Injury by Using Body Condition Scoring*. Comp Med, 2019. **69**(2): p. 95-102.
26. Scholten, D., et al., *The carbon tetrachloride model in mice*. Lab Anim, 2015. **49**(1 Suppl): p. 4-11.
27. Aston, W.J., et al., *A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 684.
28. Cella, P.S., et al., *Doxorubicin causes cachexia, sarcopenia, and frailty characteristics in mice*. PLoS One, 2024. **19**(4): p. e0301379.
29. Hampton, A.L., et al., *Ulcerative Dermatitis in C57BL/6NcrJ Mice on a Low-Fat or High-Fat Diet With or Without a Mineralized Red-Algae Supplement*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015. **54**(5): p. 487-96.



## Form Project proposal

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	Targeting aging pathways to improve healthspan

### 2 Categories

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

#### **Definitions** (in alphabetical order)

**ADME:** Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. Assays to address the properties for a compound, or DevCan, in vivo before clinical translation can commence. Sometimes combined with Toxicity into ADMET.

**ALS:** Amyotrophic Lateral Sclerosis. A progressive neurodegenerative disease that affects motor neurons in the brain and spinal cord, leading to muscle weakness, paralysis, and eventually respiratory failure. [1]

**AD:** Alzheimer's Disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the decline of cognitive functions, including memory, reasoning, and language. It is the most common cause of dementia in older adults.[2]

This is effective against specific senescent cells and senescence-like cancer cells in vitro and in vivo and is being explored for clinical translation.

**DevCan:** Development Candidate. Once a compound has sufficiently passed efficacy testing and non-GLP safety/toxicity and PK testing, it may become "nominated" for actual clinical translation. At that point, the compound is called a Development Candidate, or DevCan. This still does not mean it can readily be examined in patients, as it needs to undergo stringent GLP-Toxicity (and PK) studies.

**Drug:** Once a DevCan has received market approval, it is classified as a "drug".

**GLP:** Good Laboratory Practice. The industrial standard needed to test if a compound can be progressed into clinical trials, most notable for Safety/toxicity (GLP-TOX), PK (Pharmacokinetics) and ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion).

**Healthspan:** The period of an organism's life during which it remains healthy, free from chronic diseases, and maintains functional capacity. It emphasizes quality of life rather than duration.

**Lifespan:** The total duration of time an organism lives, measured from birth to death. It reflects the length of life but does not indicate the quality of life during aging.

**PK:** Pharmacokinetics. The distribution and retention of a compound, or a DevCan, in vivo.

**SASP:** Senescence Associated Secretory Phenotype – A complex secretory state of senescent cells, containing (matrix-degrading) proteases, growth factors and pro-inflammatory cytokines that permanently interfere with signaling of their microenvironment. There are different types of SASP, which have different consequences. Scarred cells generally secrete IL1 and IL6/8, which, through I $\kappa$ B signaling, drive nearby cells into a more stem-like state.

**Scarring/scarred cells:** Cells which present with a specific subset of biomarkers of cellular damage, i.e. a [redacted] Not all senescent cells express these markers, but the ones that do are better targets for [redacted]

**Senescence:** A phenotype that occurs in response to irreparable cellular damage and which leads to a SASP. Senescent cells are typically apoptotic resistant and accumulate during aging. Their accumulation can be accelerated by damaging treatments, such as small molecules and chemo-/radiotherapy. When senescent cells occur in the stroma/(Tumor Micro Environment (see definition below), the cancer cells directly flanking them become more proliferative, stem-like and p53-positive. Not all senescent cells are the same (like not all cancer is the same) and there are differences in the composition of SASP factors. There are common denominators, however, in that senescent cells generally are devoid of proliferation and positive for stress



need extra help to cross the cell membrane. To this end, [REDACTED] have been designed to contain an additional domain to facilitate cellular uptake. Thus, [REDACTED] offer a safe and effective option for long-term use in patients.

[REDACTED] potently target scarred senescent cells

We have previously characterized one subtype of senescence expressing elevated forms of [REDACTED]. We named these senescent cells "scarred". To target these cells, we developed [REDACTED]. These [REDACTED] induce a potent apoptotic response and show convincing selectivity against scarred senescent cells compared to healthy cells. We have previously shown that targeting scarred senescent cells can improve the healthspan of mice. An earlier version of this [REDACTED]

[REDACTED] Over recent years, we optimized [REDACTED] resulting in an even more potent and selective effect on scarred cells. In project [AVD1150020199125](#), the optimized version, named [REDACTED] proved to reduce frailty in naturally aged mice. Furthermore, we observed that low-level treatment with [REDACTED] extends the lifespan of geriatric mice (27 months of age at the start of the experiment) and, excitingly, it strongly maintains cognitive function until end of life. [REDACTED] shows excellent bioavailability, stability, pharmacokinetics and safety *in vivo* and is already in GLP-Toxicity studies. Thus, we have demonstrated the feasibility of targeting senescent cells *in vivo* with potential for clinical translation.

Defective stemness prevents tissue regeneration and repair during aging

In addition to anti-senescence compounds, we aim to develop compounds capable of restoring healthy stem cell function. During aging, the ability of stem cells to self-renew and differentiate is compromised, impairing tissue repair and regeneration. Both intrinsic and extrinsic factors affect stemness. For example, aging stem cells accumulate DNA damage and undergo epigenetic changes, but their surrounding niche also becomes inflamed and dysfunctional (partly due to senescence). These changes contribute to tissue damage and fibrosis, and age-related diseases such as osteoarthritis, liver fibrosis, and neurodegeneration [13-15]. A focus here has lied on targeting stem-cell pathways under control of [REDACTED]. Furthermore, we have shown that removing senescent cells from injured tissue improved regeneration ([AVD1150020199125](#)). Thus, studying the link between senescence and stemness is of great interest in the current project.

Metabolism dysregulation contributes to the development of age-related diseases

During aging there is a progressive decline in the body's ability to maintain metabolic homeostasis, leading to impaired glucose metabolism, insulin resistance, and lipid dysregulation. These contribute to the development of type 2 diabetes, obesity, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). A dysregulated cellular metabolism can be further disrupted by extrinsic factors, such as inflammatory factors that are part of the SASP. Senescence therefore creates a pro-inflammatory environment that worsens systemic metabolic dysfunction. These processes accelerate the development of metabolic diseases and impair tissue function. To address this, our project also focuses on targeting metabolic pathways influenced by senescence, such as [REDACTED]

[REDACTED] By combining anti-senescence strategies with interventions aimed at correcting metabolic dysregulation, we aim to develop comprehensive therapies to combat age-related diseases and improve overall healthspan.

Unanswered questions

For the current project, several important questions remain unanswered:

- 1) While it is clear that anti-senescence treatments, e.g. [REDACTED] provide benefits in aging mice, we are now eager to investigate their effects on specific age-related diseases to further understand its therapeutic potential. Our strategy is to select relevant diseases and matching mouse models based on whether senescent cells are expected to play a role in the disease, particularly the "scarred" subtype. As an example of this strategy, we plan to first test [REDACTED] in Alzheimer's (AD) and Amyotrophic

Lateral Sclerosis (ALS) mouse models. Senescent cells have been shown to drive neuroinflammation, neurodegeneration and cognitive decline [16, 17], and genetic ablation of senescent cells has been shown to alleviate these symptoms in naturally aged mice and in mouse models of AD [16, 17]. We have also identified scarred senescent cells in ALS mouse models and demonstrated their deleterious effects in *in vitro* co-cultures experiments. Therefore, we plan to investigate the efficacy of [REDACTED] in ALS and AD mouse models.

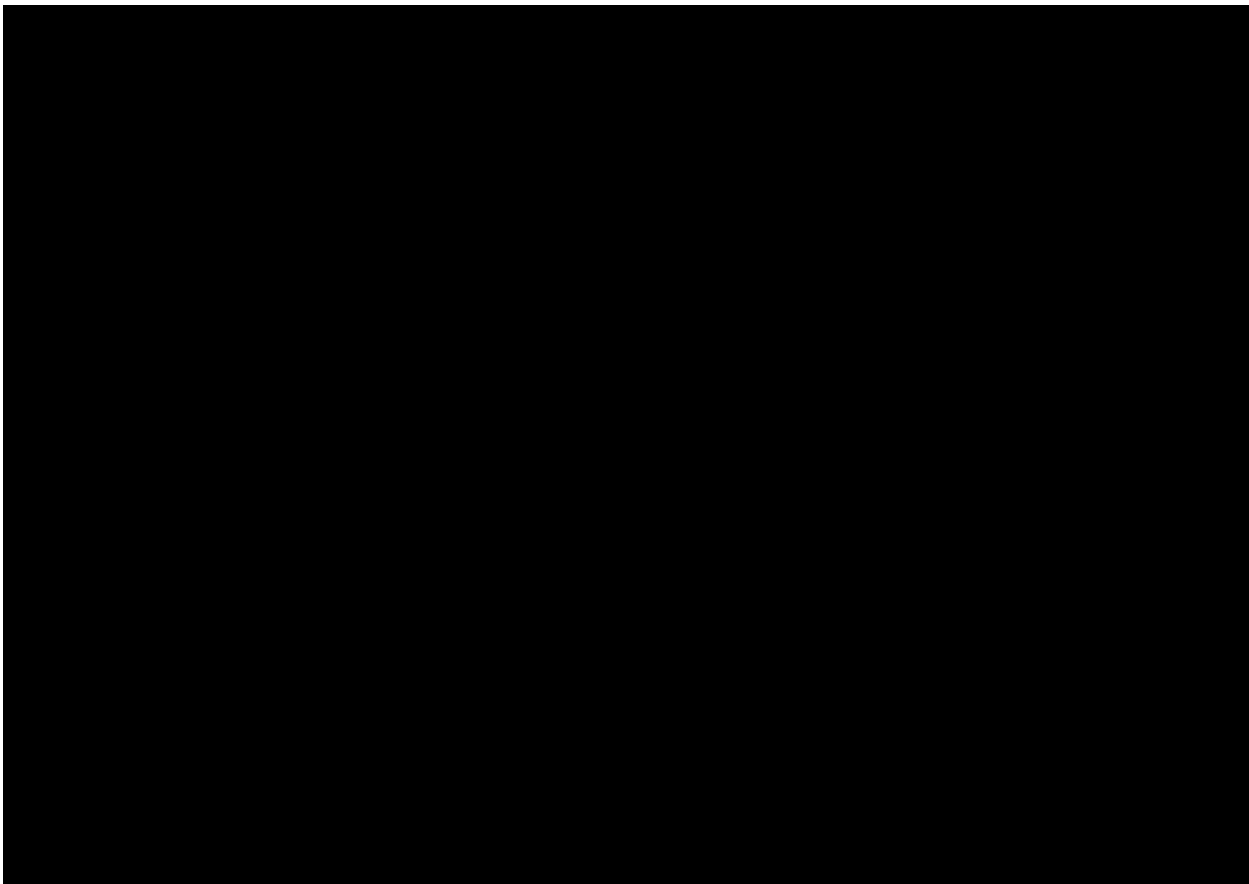
- 2) Besides the scarred subtype of senescence, we aim to study other subtypes of senescence. I.e. examining when and where they develop and what pathological consequences they may have. This will allow us to test novel compounds tailored to target these specific senescence subtypes. Which mouse model will be used, depends on the disease we link the subtype to.
- 3) The new project will also facilitate the evaluation of novel anti-aging [REDACTED] that target other critical aspects of aging, such as stem cell dysfunction and metabolic dysregulation. These are directed against metabolism of senescent and cancer cells, such as [REDACTED]

In conclusion, we will here test the potential of targeting features of age-related/chronic diseases through compounds designed to interfere with senescence-related pathways, dysfunctional stemness or metabolic dysregulation, primarily:

- [REDACTED]
- New compounds in R&D, [REDACTED] *In vitro* experiments with [REDACTED] are ongoing and it is very likely that there will be a need to test them *in vivo* within the next 5 years.

These studies will provide valuable insights into the interplay between these processes. In designing studies to test novel compounds, we will follow a "go/no-go" decision tree before deciding on whether and how to test them *in vivo*.

The project goals are summarized in 3.2 and figure 1.



*Figure 1: summary of previous research and follow-up questions that will be addressed in the current project*

License AVD11500202418434

In addition to the project described in this application, we have a CCD permit in place (AVD11500202418434) to test novel compounds against aggressive cancer. The models used in the experiments performed under that license employ very different models, since they rely primarily on cancer cell engraftment and key outcome parameters such as tumor volume, metastasis and survival. However, some novel compounds show activity against both cancer and senescent cells. As efficacy in a cancer model does not necessarily imply efficacy against senescence-related diseases, the compounds will be tested in both projects. Most of the compounds in the new application are specifically designed to target senescent cells rather than cancer.

Findings from both projects will help avoid unnecessary repetition of experiments. For example, insights into treatment regimens and dosing from one project can streamline optimization in the other. In addition, shared technical procedures are refined in one project before being applied in the other. Because both projects are conducted by the same researchers, knowledge transfer is efficient and maximized.

---

**3.2 Purpose**

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The ultimate goal of the project is to develop [REDACTED] that are able to improve healthspan during aging.

The project has both a fundamental and translational aspect, with distinct immediate goals:

- (I) To gain a deeper comprehension of the role of cellular senescence, dysfunctional stemness and dysregulated metabolism in age-related pathological processes.

- (II) Evaluate the potential of compounds we develop to alleviate age-related diseases, addressing a major unmet medical need.

To achieve these objectives, several sub-objectives must be met:

- 1) Investigate when and where (subtypes of) senescence, dysfunctional stemness and dysregulated metabolism spontaneously develops during aging and age-related diseases, to better understand its role in pathology (appendix 1). Cell models cannot be employed to answer our research questions for several reasons: they do not allow all cell types of an organ to be grown simultaneously, they cannot be maintained for months, senescent cells do not develop spontaneously and therefore the timing of their emergence cannot be studied, systemic effects cannot be analyzed, and the relationship between the emergence of senescent cells and the occurrence of disease symptoms cannot be studied.
- 2) Actively induce senescence to functionally investigate the pathological consequences of (subtypes of) senescence and to evaluate its effect on dysfunctional stemness and dysregulated metabolism (appendix 2). Also here mouse experiments are crucial for determining systemic effects and the occurrence of disease symptoms.
- 3) Spatiotemporally image senescence in these models (both appendices). It is possible to perform post-mortem analyses to detect senescent cells, but more information can be obtained by tracking the senescent cells spatially and longitudinally.
- 4) Determine the efficacy of novel drugs *in vivo* against spontaneously developed pathologies. This includes peptides against [REDACTED]. In appendix 1, we will focus primarily on the potential of novel therapies to counteract age-related frailty and treat incurable age-related neurodegenerative diseases, with a focus on Alzheimer's disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).
- 5) Determine the efficacy of novel compounds *in vivo* against induced senescence, age-related dysfunctional stemness and dysregulated metabolism. This includes [REDACTED] (appendix 2). These models are ideal for investigating the localized effects of e.g. senescent cell removal. Here, we will mainly focus on damage or disrupted stemness/metabolic pathways in the lung, liver and adipose tissue.

### 3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The project is a continuation of previously performed and ongoing *in vivo* experiments from [AVD1150020199125](#). We have extensive experience in preclinical research and drug development. Our team includes multiple Article 13f2 technicians and Article 9 researchers who oversee the design and execution of projects. All experiments will therefore be conducted by well-trained animal technicians and scientists, many of whom are senior staff involved in local training and animal handling programs. Additionally, we have secured funding from a variety of academic grants, public-private partnerships, and industrial sources for the preclinical development of compounds.

We have the technological expertise and scientific background necessary to carry out these experiments. Our team has published both *in vitro* and *in vivo* studies on senescence in models of chemotoxicity and accelerated aging [12]. Furthermore, the team is skilled in *in vivo* imaging and functional and behavioral assays in mice. All experiments will be carried out using optimized protocols to minimize the number of animals used while ensuring reliable, reproducible results. Additionally, we have gathered extensive *in vitro* data on the molecular hallmarks of senescence and the effectiveness of new anti-senescence drugs. This combined expertise ensures we can execute the experiments effectively and make sound decisions at critical points in the project (see go-/no-go decision moments).

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

Click or tap here to enter text.

### 3.3 Relevance

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

#### Scientific relevance

The scientific goal of this project is to better understand where and when senescence subtypes, dysfunctional stemness or dysregulated metabolism develop *in vivo* during aging and disease. In previous research (AVD1150020199125), we have confirmed the presence of one senescence subtype (scarred senescent cells) in naturally aged mice and showed that removing these cells improved cognitive function and reduced frailty. In this project, we will continue working towards the stated scientific goal, by examining scarred senescence in specific age-related pathologies. Furthermore, by inducing senescence subtypes in healthy tissues, we aim to determine how they contribute to pathologies. This will provide a better understanding of how senescent cells interact with their environment, for example, how these may in turn affect tissue renewal, stemness and metabolism.

#### Societal relevance

The prevalence of age-related diseases increases with an aging population. As an example, worldwide dementia is predicted to increase from 47 million cases to 131 million in 2050. Thus, enhancing healthspan in older age would not only improve individual lives but also benefit society as a whole. There is a pressing need for more effective treatments to combat age-related diseases. Targeting senescent cells and improving regeneration represents a promising strategy, given the contribution of these processes to the development of multiple pathologies. The principal objective of our research is, therefore, to develop compounds that can be translated into clinical therapies.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Patients: patients would ultimately benefit from successful research and new treatments, since these treatments could improve their health significantly

The animals involved in the project: While we strive to investigate as much as possible *in vitro*, some animal experiments in mice (and, beyond this project, rats and non-rodent mammals) are needed before clinical translation can commence. This means these animals will be exposed to a disease or treatment that may cause discomfort, and ultimately killed.

Scientists: the project will advance knowledge on the presence and development of senescent cells in mouse models for aging. This will contribute to knowledge on the systemic effects of (subtypes of) senescence. Thus, the results of cell culture experiments can be validated in a more complex system.

Public and private funding agencies: we receive public financing through academic grants and public-private-initiatives, as well as private funding from investors. Moreover, through this CCD license, those funders will be able to bring their therapies to the clinical and expand knowledge on scientific Mechanisms of Action. These partners seek progress in scientific advancement or therapeutic translation, as well as in fast(er) implementation of therapies – which would be much harder, if not currently impossible, without these animal experiments presented here.

The biotech company: The biotech company conducting (part of) the research on this CCD license has a direct interest in the successful development and validation of novel compounds to generate robust preclinical data that can support the transition to human clinical trials. Success in this project could lead to the advancement of the company's pipeline, resulting in new therapeutic products. Investors of the biotech company are not involved in Go/no-go decisions.

UMC Utrecht: the project will advance knowledge on senescence and aging, which will contribute to publications and research grants.

### 3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

The aim of this project is to study the role of cellular senescence, dysfunctional stemness and dysregulated metabolism in aging and to test novel compounds to alleviate age-related diseases. To achieve this, we have separated the experiments in two appendices:

- In appendix 1, mouse models are employed where senescent cells, dysfunctional stemness and dysregulated metabolism develop by their own, i.e. naturally aged mice, accelerated aging models, or age-related disease-specific mouse models.
- In appendix 2, we describe experiments in models where senescence, dysfunctional stemness and dysregulated metabolism are induced, i.e. by damaging agents, diet, or senescent cell engraftment

The strategy for the entire program is outlined in the figure 3, with **Phases 2 and 3** representing the *in vivo* portion discussed in this proposal.

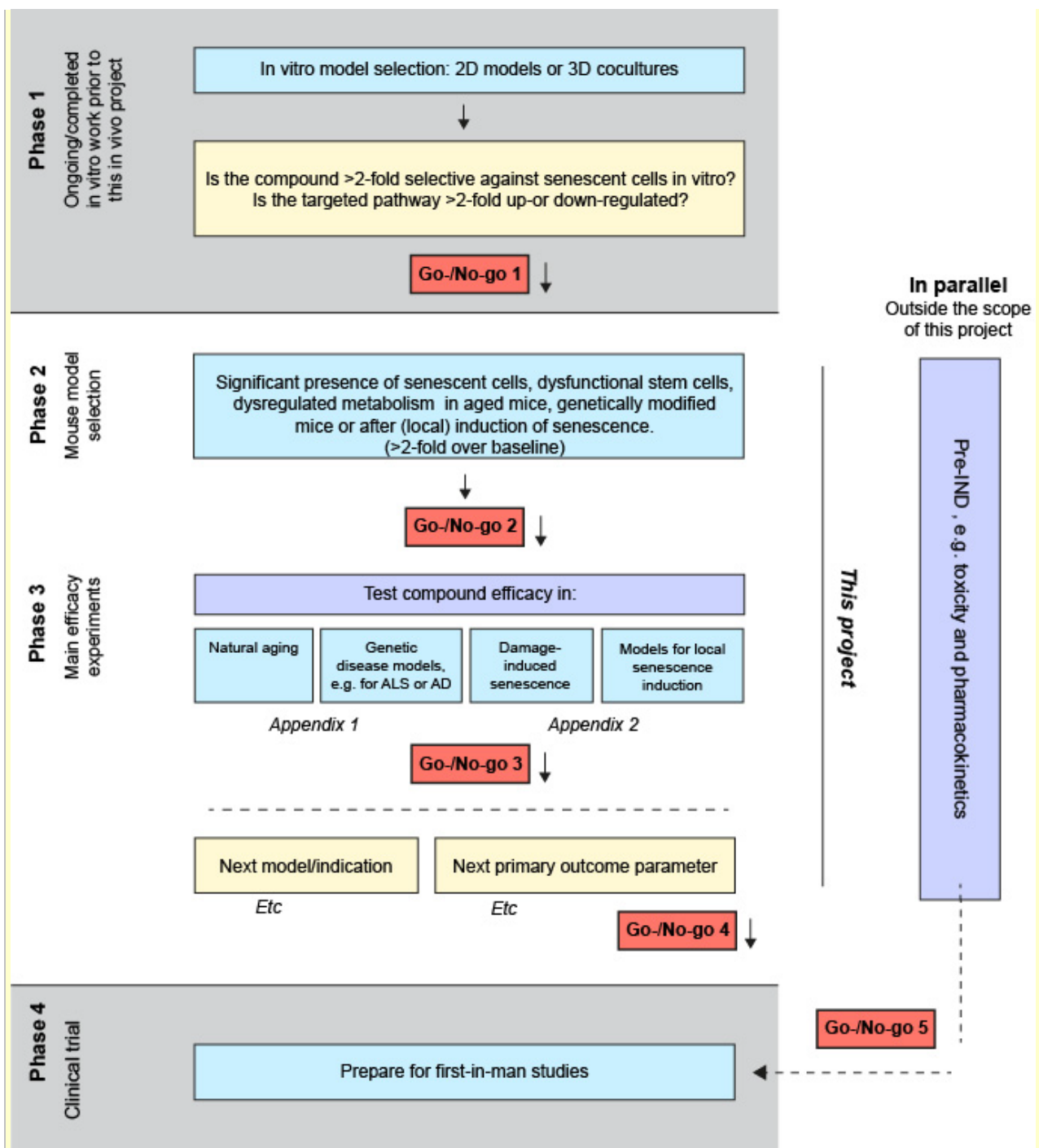


Figure 3: summary of the project phases and Go-/No-go decisions

### Phase 1: in vitro research

Before starting *in vivo* experiments, extensive *in vitro* studies will test conditions that induce senescence subtypes, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism, and assess the potency and selectivity of novel drugs.

- In this phase, senescence subtypes are characterized, and suitable biomarkers identified. This information is crucial for the *in vivo* detection of these subtypes, enabling the assessment of their occurrence and whether they are removed by potential compounds. Furthermore, novel anti-senescence compounds are evaluated in comparison to healthy non-senescent cells in standardized 2D assays and more complex 3D coculture systems. Ultimately, only compounds with at least a 2-

fold selectivity against senescent cells over healthy cells will advance to *in vivo* experiments **(Go/No-go 1)**. This criterion is based on our previous research, where we tested an anti-senescence compound in multiple *in vitro* systems and later showed *in vivo* efficacy without off target adverse effects. The selectivity in the employed *in vitro* models ranged from 2-fold to >10 fold selectivity for senescent cells.

- When we aim to test [REDACTED] this compounds would need to show superior selectivity and/or efficacy *in vitro*. For instance, by reducing the concentration needed.
- Stemness markers and the pathways involved are largely known for numerous tissues. In phase 1, we will determine whether newly designed compounds indeed interrupt the protein-protein interaction they have been designed for, and whether the downstream pathway is indeed affected in the intended way. The efficacy of the novel compound is measured by the up- or down-regulation of downstream targets of the pathway. These should be at least 2-fold up- or down-regulated **(Go/No-go 1)**. In this phase we can also determine to some extent the regeneration of damaged 3D cocultures after treatment with novel compounds.
- The effect of a novel compound on a key metabolic pathways will be investigated in 2D cultures. Again, the pathway of interest should be at least 2-fold up- or down-regulated by the novel compound **(Go/No-go 1)**.

**Go-/no-go 1:** at least 2-fold selectivity in reducing viability of senescent cells vs. healthy cells, a reduction of minimal 2-fold in (deleterious) [REDACTED] (3) or 2-fold reduction in novel pathways (4).

For example:

- A. For development candidate [REDACTED] we obtained ample evidence that this compound is selective against cells harboring [REDACTED] senescent cells. This compound has therefore already passed the go-/no-go criteria.

With regard to compounds in earlier development

- B. [REDACTED]
- C. [REDACTED]
- D. [REDACTED]
- E. [REDACTED] is perturbed in numerous diseases, e.g. inflammatory bowel disease. Several biopharma companies have showed an interest in development of compounds breaking such an interaction. We developed a [REDACTED] than does so *in vitro*. Further modifications may be made to make this more selective for chronic/elevated vs. healthy [REDACTED]
- F. As this is a long-term project, we would also keep the option to test new compound in early development (or yet to be developed), based on these selection criteria

The development of these more advanced 3D *in vitro* models is also a part of Phase 1. For instance, we make use of (iPSC-)derived 3D multicellular structures for liver, kidney and brain. These models allow for advanced mechanistical studies into the interaction between senescent cells and their surrounding cells. Furthermore, the selectivity of a novel compound in targeting the senescent cells in these structures can be determined.

### **Phase 2: in vivo model characterization and optimization**

In phase 2, we evaluate if we can detect the targets of our novel compounds in mouse models for age-related pathology. For example, to characterize senescence subtypes and to study the effect of novel anti-senescence compounds, we want to use animal models in which the senescent cells of interest are actually present. This phase differs between appendices:

- Appendix 1: we will determine whether the selected animal model truly contains the subtype of senescent cells of interest, or whether the target of interest in a stemness or metabolic pathway is expressed. This can be achieved through post-mortem staining of tissues provided by collaborators or by consulting existing literature, provided that the model has been properly validated. Based on our *in vitro* experiments, we will already know in which model to check and which tissue to stain. For example, we studied markers of scarred senescence in brain cells, which led us to stain brain tissue from ALS mice. In phase 2 of appendix 1, we will not be using animals for this license, only already available tissues.
- Appendix 2: for a new model, e.g. the implantation of senescent cells or chemical induction of senescence, a pilot study is required to confirm the induction of senescent cells in the tissue of interest. A maximum of 15 pilot experiments will be performed.

**Go/No-go 2:** In all models, we aim to detect increased senescence, dysfunctional stem cells, or dysregulated metabolism ( $\geq 2$ -fold) and significant health parameter changes.

### **Phase 3: full-scale experiments**

Phase 3 combines both fundamental and translational research components, exploring how different senescence subtypes, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism cause diseases, while addressing fundamental questions about pathways involved. Furthermore, the effect of our novel drugs on age-related pathologies will be determined in these full-scale experiments. In both appendices, a maximum of 8 compounds will be tested in this phase, in 1 model per compound.

**Go/No-go 3** is a 10% to 20% reduction in senescent cells [16, 17] or 10% to 20% improvement in health parameters (depending on the model). These parameters differ across multiple models:

- Naturally or rapidly aging mice: at least 20% improvement in organ function blood values. E.g., AST/ALT for liver, urea/creatinine for kidney, and amylase for pancreas.
- Neurodegeneration models: at least 10% reduction in motor function loss compared to control treated mice, as measured by grip strength, rotarod, or gait pattern, or 10% reduction in memory loss compared to control treated mice, as measured by improved latency or time in the exit zone in the Barnes test [18].
- Damage-induced senescence or senescent cell engraftment: at least 20% improvement in relevant organ function blood values.
- In high fat diet: at least 10% improvement in glucose tolerance, or a 10% reduction in blood cholesterol or LDL[19].

We will first test novel compounds against senescence subtypes, dysfunctional stem cells, and dysregulated metabolism in one mouse model. When de Go/No-go criteria are met, a compound can be tested in additional models. E.g., [REDACTED]

[REDACTED] and we will therefore test these compounds in phase 3 in additional models. In both appendices, a maximum of 8 compounds will be tested in this phase, in a maximum 4 additional models per compound.

**Go-/no-go 4:** Similar criteria as go-/no-go 3, but in additional models.

This CCD project contains *in vivo* experiments for several projects. Many of these are academic, but several of them are also because of preclinical development into the clinic. Some of those are co-sponsored by industry / private partners, all geared towards making such clinical translation feasible. This sometimes means that certain experiments need to be expanded once successful, for instance using a different concentration of dosing scheme. Industrial partners and investors see many animal experiments. To ensure continuation of these projects and proper preclinical development of a compound, it sometimes needs to be thoroughly examined, e.g. vs. standard of care, or to see if a different dosing frequency can yield even better results. Such decisions are not taken lightly and are only made if we consider changing parameters to be impactful.

**Parallel Phase** (external Contract Research Organization; outside of the scope of this project proposal): Even if we obtain successful efficacy data through experiments in this CCD license, or from 3rd party efficacy experiments, it is not yet a given that a compound can be tested in clinical trials. Once the compound has sufficiently passed efficacy and early safety testing, it is then called a development candidate, or DevCan.

For a DevCan to actually proceed into clinical trials, it needs to be assessed for safety/toxicity in GLP- (Good Laboratory Practice) - Tox studies. The guidelines of the European Medicines Agency (EMA) or the American Food and Drug Administration (FDA) typically require this to be conducted in one rodent and one non-rodent species. The latter often being Non-Human Primates, but sometimes other species. While mice are ideal for small efficacy work, they are less suitable for GLP-Tox work as many parameters are more challenging to measure. Therefore, non-GLP work can often be conducted in mice in order to get a rough idea of where and when toxicity may occur. However, for GLP-TOX, the rodent species of choice is typically rat. Ultimately, the Medicines Evaluation Board (MEB; in Dutch: College ter Beoordeling Geneesmiddelen; CGDB), decides on market approval of a DevCan – why at that point becomes labeled as a drug. As such, it is the combined advice from the EMA/FDA with the MEB that dictates how these studies will look like for a DevCan. These studies are specifically designed to investigate toxicity and therefore it is not uncommon to pass this stage. However, if a DevCan turns out to have severe or unexpected side-effects at low doses (e.g. close to efficacious dose), this may severely delay its translation or kill the project altogether.

**Go-/no-go 5:** Positive evaluation of safety data in at least one rodent and one non-rodent species (often non-human primates). If a DevCan shows extreme or unexpected toxicity at doses close to efficacious dose, this may qualify as a no-go.

#### 3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

- A) For successful clinical translation, *in vivo* experiments are essential to identify relevant diseases and study symptoms that cannot be adequately modelled *in vitro*. While *in vitro* systems provide valuable insights into cellular mechanisms, they often lack the complexity of whole-organism interactions, such as immune responses, tissue regeneration, and systemic effects of drug treatments. Importantly, age-related diseases are multifactorial and far more complex than what can be replicated in tissue culture models. Key clinical symptoms of age-related diseases, such as frailty and cognitive decline, can only be properly assessed in a living organism. These *in vivo* studies are therefore essential for capturing the full therapeutic potential of new treatments.
- B) ██████████ represent a promising class of novel therapeutics. We have obtained strong *in vitro* evidence that ██████████ interaction effectively eliminate a subset of senescent cells characterized by biomarkers ██████████. Moreover, ██████████ have shown efficacy in targeting senescent cells *in vivo*, improving healthspan in naturally aged mice (████████ AVD1150020199125). Additionally, we obtained *in vitro* evidence for new compounds against perturbed ██████████ which are presumed to play deleterious roles in specific age-related / chronic pathologies where the biomarkers for these processes are prevalent.

- C) We included naturally aged mice in this project, since they more accurately reflect the gradual, multifactorial aging process compared to genetically modified mouse models.
- D) Rapidly aging mouse models are advantageous at times because senescence occurs more quickly and at higher levels compared to natural aging, providing a larger window to assess treatment effects. These models are therefore great to test novel compounds.
- E) Emerging research has revealed a strong link between various forms of neurodegeneration and cellular senescence [2, 7]. Senescent astrocytes have been detected in the brains of aged humans [20], and recent studies show that senescent glial cells in mice can drive neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive decline [21, 22]. Notably, the genetic clearance of senescent cells has been shown to mitigate both cognitive decline and neuroinflammation in naturally aged mice and in mouse models of Alzheimer's disease [21, 22]. Beyond AD, we have also identified senescent cells in the brains of ALS mouse models and demonstrated their harmful effects in co-cultures of neuronal cells and senescent support cells. Therefore, we plan to investigate the efficacy of [REDACTED] in ALS and AD mouse models.
- F) Damage-induced and high-fat diet-induced senescence models likely involve distinct senescent cell subtypes, making them valuable for studying diverse disease pathways.
- G) The implantation of senescent cells allows for the precise selection of the specific type of senescent cell to be studied in relation to its effect on the surrounding tissue and the body as a whole.
- H) Implementing a multi-phase strategy that begins with *in vitro* testing and progresses to carefully selected *in vivo* models aligns well with the principles of the 3Rs:
  - By conducting initial screenings *in vitro*, the novel compounds that progress to animal testing is limited, since only the most potent compounds will be advanced.
  - The subtype of senescence is evaluated *in vitro*, particularly to assess whether it has detrimental effects on the surrounding environment, such as in co-culture systems. However, *in vivo* experiments remain essential because systemic effects, including interactions between organs and tissues, cannot be fully captured *in vitro*.
  - We identify biomarkers to predict sensitivity to the compounds. Thus, novel compounds are not randomly tested *in vivo*, but applied based on a rationale. This will reduce unnecessary *in vivo* experiments.
  - The number of animals used in full scale experiments is reduced by the selection of reliable models that show limited variation. This is achieved by performing pilot experiments first (mainly for damage-induced senescence) or knowledge of previous experiments or collaborators.
  - We will first test a novel compound in a single, well-established model, and then use the results to decide whether to expand testing to additional readouts or models.

3.4.3 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	Analysis of novel compounds in aging models
2	Analysis of novel compounds in senescence-induction models
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.

1. Masrori, P. and P. Van Damme, *Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review*. European Journal of Neurology, 2020. **27**(10): p. 1918-1929.

2. Breijyeh, Z. and R. Karaman, *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment*. *Molecules*, 2020. **25**(24).
3. Abou-Ghali, M. and V. Lallemand-Breitenbach, *PML Nuclear bodies: the cancer connection and beyond*. *Nucleus*, 2024. **15**(1): p. 2321265.
4. Campisi, J., *Aging, Cellular Senescence, and Cancer*. *Annual Review of Physiology*, Vol 75, 2013. **75**: p. 685-705.
5. Coppé, J.P., et al., *Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor*. *Plos Biology*, 2008. **6**(12): p. 2853-2868.
6. Baker, D.J., et al., *Naturally occurring p16 -positive cells shorten healthy lifespan*. *Nature*, 2016. **530**(7589): p. 184-+.
7. Chinta, S.J., et al., *Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease*. *Cell Reports*, 2018. **22**(4): p. 930-940.
8. Chen, W., et al., *Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Six Subpopulations Reflecting Distinct Cellular Fates in Senescent Mouse Embryonic Fibroblasts*. *Frontiers in Genetics*, 2020. **11**.
9. Faget, D.V., Q.H. Ren, and S.A. Stewart, *Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2019. **19**(8): p. 439-453.
10. Kumar, P., et al., *Delineating the heterogeneity of senescence-induced-functional alterations in hepatocytes*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2024. **81**(1).
11. Kirschner, K., et al., *Functional heterogeneity in senescence*. *Biochemical Society Transactions*, 2020. **48**(3): p. 765-773.
12. [REDACTED]
13. Akcora, B.O., G. Storm, and R. Bansal, *Inhibition of canonical WNT signaling pathway by beta-catenin/CBP inhibitor ICG-001 ameliorates liver fibrosis in vivo through suppression of stromal CXCL12*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. **1864**(3): p. 804-818.
14. Jia, L., J. Pina-Crespo, and Y. Li, *Restoring Wnt/beta-catenin signaling is a promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease*. *Mol Brain*, 2019. **12**(1): p. 104.
15. Lietman, C., et al., *Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling ameliorates osteoarthritis in a murine model of experimental osteoarthritis*. *JCI Insight*, 2018. **3**(3).
16. Xu, M., et al., *Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age*. *Nature Medicine*, 2018. **24**(8): p. 1246-+.
17. Yousefzadeh, M.J., et al., *Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan*. *EBioMedicine*, 2018. **36**: p. 18-28.
18. Arnold, E.S., et al., *ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. **110**(8): p. E736-E745.
19. Liang, H.J., et al., *A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice*. *Experimental Animals*, 2021. **70**(1): p. 73-83.
20. Melo Dos Santos, L.S., et al., *Cellular senescence in brain aging and neurodegeneration*. *Ageing Res Rev*, 2024. **93**: p. 102141.
21. Bussian, T.J., et al., *Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline*. *Nature*, 2018. **562**(7728): p. 578-582.
22. Ogrodnik, M., et al., *Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice*. *Aging Cell*, 2021. **20**(2): p. e13296.

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : AVD11500202518734
2. Titel van het project : Targeting aging pathways to promote healthspan
3. Titel van de NTS : Tegengaan van verouderingsroutes om gezondheid te verbeteren

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 18-2-2025  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 19-2-2025 en 19-3-2025  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot: 24-2-2025 / 5-3-2025 en 21-3-2025 / 26-3-2026  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 31-3-2025

## 7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 19-3-2025
- Plaats: Online via Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 8
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk en uitvoerende onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, die ook schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 24-2-2025
- Datum antwoord: 5-3-2025
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op **19 februari 2024** beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

Projectvoorstel

3.2 Doel

1) Kunt u aangeven hoe deze aanvraag zich verhoudt ten opzichte van de vergunning die in december 2024 (AVD11500202418434) met de titel Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, senescence and metastasis ingediend is, en wat de toegevoegde waarde is van deze nieuwe aanvraag? Hoe trekt u lessen uit het ene project voor het andere en voorkomt u onnodige herhaling?

*Antwoord: Beide aanvragen zijn essentieel voor ons onderzoek. Onder CCD-vergunning AVD11500202418434 voeren we experimenten uit waarin we nieuwe stoffen testen tegen (uitgezaaide) kanker. In de nieuwe aanvraag willen we stoffen onderzoeken die specifiek gericht zijn tegen senescente cellen en de negatieve gevolgen ervan voor de gezondheid. Hiermee hopen we ouderdomsziekten, zoals Alzheimer en leverfibrose, te kunnen tegengaan.*

*De modellen die we in AVD11500202418434 gebruiken, verschillen aanzienlijk van de verouderingsmodellen in de nieuwe aanvraag. In AVD11500202418434 werken we voornamelijk met modellen waarin we kankercellen implanteren in muizen en vervolgens tumorgroei en metastasering bestuderen. De primaire uitkomstparameters zijn daarbij meestal tumorvolume, het aantal uitzaaiingen en de levensduur. In de nieuwe aanvraag gebruiken we modellen voor veroudering en ouderdomsziekten. Hier wordt levensduur soms ook onderzocht, maar daarnaast richten we ons op eindpunten zoals verbeterd gedrag, orgaanfunctie en ziekteverschijnselen.*

*Hoewel sommige van de nieuwe stoffen in beide aanvragen worden getest, omdat ze zowel tegen senescente cellen als kankercellen actief kunnen zijn, betekent een positieve werking in een kankermodel niet automatisch dat ze ook effectief zijn tegen senescente cellen of ouderdomsziekten kunnen verlichten. Bovendien zullen de meeste stoffen in de nieuwe aanvraag specifiek ontwikkeld zijn om (de gevolgen van) senescente cellen aan te pakken en niet primair gericht zijn op kanker.*

*We trekken zeker lessen uit beide projecten om onnodige herhaling van experimenten te voorkomen. Zo verkrijgen we bijvoorbeeld waardevolle informatie over behandelingschema's en doseringen uit het ene project, wat optimalisatie in het andere project kan vergemakkelijken. Ook zijn er enkele technische handelingen die overeen komen en dus al geoptimaliseerd zijn binnen het ene project voordat ze toegepast worden in het ander. Beide projecten worden uitgevoerd door dezelfde onderzoekers, wat zorgt voor een efficiënte toepassing van de verkregen kennis.*

*Dit is nu ook kort uitgelegd in het projectvoorstel.*

2) Waarom bestudeert u sub-objective 1 en 2 in dieren, terwijl het gaat over het moleculair biologische proces van veroudering? Kunt u het niet beter in cellulaire modellen bestuderen en/ of als u dat al gedaan hebt, wat is daarvan de uitkomst?

*Antwoord: In sub-objective 1 willen we onderzoeken waar en wanneer verschillende senescente subtypes zich ontwikkelen en welke negatieve gevolgen ze hebben voor omliggend weefsel en volledige organen. In celmodellen hebben we al bestudeerd hoe senescente cellen hun buurcellen beïnvloeden, en de subtypes die we hebben onderzocht, hebben aantoonbaar een negatieve impact op hun omgeving. Echter, deze celmodellen schieten om meerdere redenen tekort in het beantwoorden van onze onderzoeksvragen:*

- Ze laten niet toe om alle celtypes van een orgaan tegelijkertijd te kweken.*
- Ze kunnen niet gedurende maanden in stand worden gehouden.*
- Senescente cellen ontwikkelen zich niet spontaan, waardoor de timing van hun ontstaan niet bestudeerd kan worden.*
- Systemische effecten kunnen niet worden geanalyseerd.*
- De relatie tussen het ontstaan van senescente cellen en het optreden van ziektesymptomen kan niet worden onderzocht.*

*Voor sub-objective 2 willen we senescente cellen induceren of implanteren om hun effect op omliggend weefsel te bestuderen. Dit is in celmodellen eenvoudiger te onderzoeken en hebben we grotendeels al uitgevoerd. Toch zijn uiteindelijk muizenexperimenten nodig om bijvoorbeeld systemische effecten en de link met ziektesymptomen te kunnen vaststellen. We voeren een muizenexperiment alleen uit wanneer we in celmodellen hebben vastgesteld dat een specifiek senescent subtype interessante effecten heeft op de buurcellen, zoals verandering in stamcel pathways of verandering in metabole processen.*

*Deze uitleg is toegevoegd aan het projectvoorstel.*

### 3.3 Belang

3) Hoe verhouden de zakelijke partners zich tot de wetenschappelijke besluitvorming binnen het project? Welke rol spelen zij bij de beslissingen die genomen worden in de go- no go's, zoals bijvoorbeeld over welke compounds er getest worden?

*Antwoord: De wetenschappers hebben de go/no-go criteria opgesteld en beslissen daarmee welke stoffen in muizen getest kunnen worden en in welke modellen. De zakelijke partners keuren het budget voor de experimenten goed. Als er bijvoorbeeld meerdere stoffen voldoen aan de go-/no-go criteria, bepalen de investeerders hoeveel van deze stoffen daadwerkelijk getest gaan worden. In praktijk komt dit erop neer dat ze alleen geld willen steken in experimenten waarin we erg overtuigende resultaten verwachten. Dit komt overeen met de go-no go's en is meestal zelfs strenger dan de wetenschappelijke go-no go's die wij hebben opgesteld.*

### 3.4 Strategie

4) In welke mate is 10-20% vermindering in senescent cells klinisch relevant? Kunt u uw keuze hiervoor onderbouwen?

*Antwoord: Een 10-20% vermindering in senescente cellen kan klinisch relevant zijn, afhankelijk van de context waarin deze afname optreedt. In verouderde weefsels kan de belasting door senescente cellen aanzienlijk zijn. Senescente cellen scheiden namelijk pro-inflammatoire en weefselbeschadigende factoren uit wat leidt tot verdere schade en verstoring van het omliggende weefsel. Een bescheiden vermindering van senescente cellen kan disproportioneel grote effecten hebben op het weefsel doordat het niveau van deze factoren aanzienlijk wordt verlaagd. Er zijn referenties toegevoegd die dit onderschrijven.*

5) U beschrijft, dat u post-mortem analyses uitvoert op weefsels van andere onderzoekers. Waarvoor gebruikt u dan nog de dieren in bijlage 1? Gebruikt u ook weefsels van eigen muizen voor post-mortem onderzoek?

*Antwoord: We gebruiken de weefsels van andere onderzoekers uitsluitend om te analyseren of (subtypes van) senescente cellen of biomarkers van relevante stemness- of metabole pathways aanwezig zijn. Dit helpt ons te beoordelen of een bepaald muismodel geschikt is voor onze onderzoeksvraag, voordat we een volledige muizenproef opzetten.*

*Deze post-mortem weefsels kunnen echter geen inzicht geven in de effecten van onze stoffen op het weefsel of op ziektesymptomen. Bovendien zijn deze weefsels meestal afkomstig van slechts één tijdstip, waardoor we de timing van het ontstaan van senescente cellen niet kunnen bestuderen. De analyse van deze weefsels dient dan ook uitsluitend voor modelselectie.*

*Daarnaast zullen we ook de weefsels uit onze eigen experimenten na afloop onderzoeken. Hiermee kunnen we bepalen waar en wanneer senescente cellen zich ontwikkelen en of onze nieuwe stoffen deze effectief verwijderen. Bovendien geeft deze analyse waardevolle informatie over de weefselintegriteit na behandeling, wat cruciaal is om de veiligheid en effectiviteit van de therapieën te beoordelen.*

6) Bij go-no go 4 beschrijft u een mogelijke herhaling (rerun) van experimenten. Wat is de reden dat u een (deel van) een experiment wilt overdoen? Kunt u toelichten en onderbouwen in welke gevallen hier sprake van zal zijn?

*Antwoord: We zullen nooit een experiment exact herhalen zonder aanpassingen. De term "rerun" is in dit geval misschien ongelukkig gekozen. Wat we bedoelen, is dat we een stof testen in hetzelfde model en met dezelfde uitkomstparameters, maar met bijvoorbeeld een gewijzigde doseringsmethode of een aangepast doseringsschema. Dit kan nodig zijn voor verdere preklinische ontwikkeling. Een dergelijke aanpassing doen we bijvoorbeeld wanneer een stof positieve effecten op de uitkomstparameters laat zien, maar nieuw inzicht suggereert dat een andere toedieningswijze of dosering mogelijk effectiever is.*

*Daarnaast kan het noodzakelijk zijn om onze nieuwe stof te vergelijken met een bestaande anti-senescence therapie, om aan te tonen dat onze stof beter werkt. Ook dit zullen we alleen uitvoeren wanneer de effectiviteit van onze stof al bewezen is en als een dergelijke vergelijking relevant is voor de verdere preklinische ontwikkeling.*

Bijlage 1 en soms ook in bijlage 2

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

7) Kunt u toelichten wanneer of op basis waarvan u kiest voor '4) Repeat (2) or (3)'?

*Antwoord: Dit is een foutje, het moet zijn "repeat (2)", oftewel herhaal de analyse na behandeling.*

8) Over alle parameters (die gemeten worden) en alle handelingen (die worden uitgevoerd) is het cumulatieve ongerief per handeling of per model in de tijd niet helder. Wilt u het maximaal aantal handelingen per parameter en model toevoegen aan uw tabel en dit afstemmen met de IvD?

*Antwoord: In overleg met de IvD hebben we bij "A: animal procedures" de tabel aangepast zodat er nu ook het maximaal aantal handelingen per test staat. Ook hebben we hier de discomfort scores weggehaald om de leesbaarheid te verbeteren. In "F: Classification of severity of procedures" hebben we een extra tabel toegevoegd die het cumulatieve ongerief per model duidelijker aangeeft. Dit alles is met de IvD overlegd.*

9) U beschrijft heel veel testen. Wat is haalbaar in hetzelfde dier? Hoeveel testen kan een dier ondergaan? Kunt u uw antwoord onderbouwen?

*Antwoord: We beschrijven inderdaad veel testen, maar deze zullen niet allemaal op dezelfde dag plaatsvinden en niet in hetzelfde dier:*

- Imaging en gedrags/gezondheidstesten worden nooit met hetzelfde dier gedaan*
- De verschillende "strength" testen kunnen op een dag gedaan worden. Dit is al in veel studies gedaan (referenties zijn toegevoegd aan de tekst), waaronder onze eigen studies, zonder een toename van ongerief.*
- De looptesten en andere mobiliteitstesten worden op een andere dag gedaan dan de "strength" testen.*
- Langere testen, zoals de Rotarod of Barnes test worden ook op steeds een andere dag uitgevoerd en minder vaak.*

*De dieren kunnen deze gedragstesten aan, zoals beschreven in meerdere studies (referenties zijn toegevoegd aan de tekst).*

B. De dieren

10) Wilt u uw keuze voor 8 compounds beter toelichten? Als u 2 effectieve compounds vindt, gaat u er dan ook nog 6 andere bij doen? Hebt u hier rekening gehouden met herhalingen voor het aantal aangegeven experimenten?

*Antwoord: Deze acht compounds zullen niet allemaal gericht zijn op hetzelfde target. Onze lead compound, ██████████ is al zeer effectief tegen zowel kankercellen als senescente cellen. We willen de flexibiliteit behouden om deze compound verder te optimaliseren, mocht uit klinische studies blijken dat verbetering nodig is, bijvoorbeeld om de opname of distributie in het lichaam te verbeteren. Daarom hebben we in de aanvraag opgenomen dat we, naast ██████████*

*Als we één of twee effectieve compounds vinden tegen een specifiek type senescente cel of een bepaalde stemness-/metabole pathway, zullen we geen verdere stoffen testen tegen hetzelfde target. Echter, senescence kent verschillende subtypes, die waarschijnlijk op diverse manieren bijdragen aan verschillende ziekten. Daarnaast zijn er veel potentiële targets binnen relevante pathways die een rol spelen in het bevorderen van weefselgezondheid en het verminderen van ziektesymptomen.*

*Er zijn dus talloze mogelijke targets en verschillende compounds die ontwikkeld zouden kunnen worden. Om dit proces beheersbaar te houden, hebben we criteria opgesteld waarmee we de meest veelbelovende compounds selecteren en het aantal te testen stoffen beperken. Deze criteria worden gehanteerd in Go/No-Go 1.*

*We hebben aangegeven dat we, naast ██████████ compounds, maximaal vijf extra nieuwe compounds zullen testen. Dit aantal is een inschatting, gebaseerd op de huidige ontwikkeling van veelbelovende nieuwe stoffen in celweekmodellen.*

#### F. Classificatie van ongerief

11) Wilt u aangeven welke handelingen, duur en frequentie een groep dieren maximaal ondergaat? U wordt verzocht deze wijzigingen af te stemmen met de IvD.

*Antwoord: Zie (8). In overleg met de IvD hebben we een extra tabel toegevoegd die het cumulatieve ongerief per model duidelijker aangeeft. De duur van het ongerief per handeling en de frequentie van die handeling staat onder "A: animal procedures".*

*In overleg met de IvD hebben we voor één model een hoger percentage ernstig ongerief vastgesteld (20% in plaats van 10% zoals in andere modellen). Dit betreft een ALS-model, waarin verlamming van de ledematen optreedt in de laatste levensfase. Ons onderzoek richt zich op het voorkomen van deze verlamming, aangezien dit de voornaamste doodsoorzaak bij ALS is. De dieren zullen worden geofferd voordat volledige ledematenverlamming optreedt. Echter, omdat er een risico bestaat dat dit onverhoopt toch gebeurt, hebben we in dit model een maximale schatting van 20% ernstig ongerief opgenomen.*

#### G. Vermindering, Verfijning

12) Is het noodzakelijk om alle modellen of opties parallel te doen of kunt u ook voor een sequentiële aanpak kiezen om het aantal gebruikte dieren te verminderen?

*Antwoord: Dit gebeurt zeker. We hebben in de aanvraag aangegeven dat we eerst een stof in 1 experiment testen om te zien hoe veelbelovend het effect is. Dit is Go/no-go 3.*

*Als de criteria voor Go/no-go gehaald zijn, wordt een stof pas verder getest in vervolg experimenten. In de praktijk zullen er dan hooguit 2 experimenten tegelijkertijd worden uitgevoerd, aangezien we niet onbeperkt personeel of budget hebben.*

13) U tilt de muis in sommige testen op aan de staart. Wilt u dit waar mogelijk vervangen door een minder stressvolle methode of wilt u indien dit door huidige validatie niet kan in een extra groep dieren aantonen dat het wel zou kunnen, of aantoonbaar is dat alleen staart hanteren mogelijk is?

*Antwoord: We willen proberen of een minder stressvolle manier mogelijk is in onze experimenten. We kunnen daarvoor de trainingdieren van bijlage 2 gebruiken.*

*Sommige technieken, zoals het bepalen van de "grip strength" kunnen helaas alleen uitgevoerd worden door het dier bij de staart vast te pakken.*

## Bijlage 2

### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

14) Om afwijkingen te induceren behandelt u de dieren met doxorubicine, paclitaxel en bleomycine. Hoe zou u het maximale ongerief daarbij classificeren? Kunt u dit onderbouwen met literatuur?

*Antwoord: Zoals beschreven bij "F. Classification of severity of procedures" lijden deze behandeling tot moderate ongerief. Ik heb referenties toegevoegd die dit onderschrijven.*

15) Wilt u het maximaal aantal handelingen per parameter toevoegen aan uw tabel?

*Antwoord: Zie (8) en (11). We hebben dit toegevoegd aan de tabel.*

### B. De dieren

16) De aantallen die in de tabel staan komen niet overeen met de aantallen die onder de tabel staan. Kunt u dit met elkaar in overeenstemming brengen?

*Antwoord: Volgens mij klopt dit wel? Onder de tabel staat de som van het aantal dieren in de tabel. Daaronder het aantal dieren die er nog bij komen voor training.*

## Niet Technische Samenvatting

17) Wilt u nog enkele typefouten verbeteren? *Antwoord: Deze zijn nu verbeterd.*

De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op **19 maart 2025** beoordeeld en heeft nog de volgende aanvullende vragen/ opmerkingen.

## Bijlage 2

Vriendelijk dank voor de antwoorden op onze vragen, maar de DEC blijft van oordeel dat de aantallen dieren in bijlage 2 niet kloppen en verzoekt u deze in overeenstemming te brengen.

- In tabel 2 dieren geeft u 4976 dieren aan, terwijl u bij de uitleg eronder op 5020 dieren uitkomt.

*Antwoord: Ik zie nu inderdaad welke tabel bedoeld wordt. In deze tabel stond de fout. Het totaal aantal dieren in de 5020+ 60 (=5080) trainingsdieren.*

- Wilt u het percentage ongerief opnieuw berekenen, wanneer het aantal dieren wordt veranderd?

*Antwoord: Het aantal dieren is onveranderd. De percentages waren berekend op basis van de 5080 dieren.*

*Niet Technische Samenvatting*

- Wilt u het aantal dieren in overeenstemming brengen met de aanvraag en bijlagen?

*Antwoord: Het aantal dieren is onveranderd. Het aantal dieren en de ongerief percentages in de NTS waren berekend op basis van de 5080 dieren.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

*De aanvraag beschrijft het onderzoek naar ziekten waarbij cellen van organen en of weefsels voortijdig verouderen ('senescence') en daardoor een negatieve invloed gaan uitoefenen op de omgeving en tot ernstige ziekten als Alzheimer of ALS kunnen leiden. Een deel van het onderzoek is bedoeld als fundamenteel wetenschappelijk onderzoek met name om meer te weten te komen over de achterliggende processen van senescence. Eerder onderzoek van deze onderzoekers heeft al uitgewezen dat er verschillende 'typen' senescence kunnen bestaan, de relatie tussen de verschillende typen en bepaalde aandoeningen zal nu verder onderzocht gaan worden. Daarnaast heeft men in vitro aangetoond dat bepaalde verbindingen senescence kunnen tegengaan en het effect op klinische parameters van de ziekten wil men nu verder onderzoeken in relevante diermodellen. De verschillende stappen zijn goed uitgeschreven met heldere beslismomenten. De DEC heeft aanvullende vragen gesteld welke hebben geleid tot aanpassingen van de aanvraag met name de navolgbaarheid van procedures en ongerief en verfijning van procedures met de dieren. Het is duidelijk dat het niet gaat om het stoppen van 'veroudering' in algemene zin en waardoor mensen ouder zouden kunnen worden, maar om degeneratieve ziekten zoals ALS en*

*Alzheimer. Het onderzoek richt zich daarmee op kwaliteit van leven en niet op kwantiteit in de vorm van levensjaren*

De aanvraag komt het meest overeen met voorbeeld 1 uit de Handreiking "Invulling Definitie Project".

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën), te weten Fundamenteel wetenschappelijk onderzoek en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is *onderzoek te verrichten naar verschillende subtypen senescence (die in vitro zijn gevonden) ook in muismodellen te vinden en met het uiteindelijke doel om dit verloop te beïnvloeden zodanig dat daarmee verdere ontwikkeling van de ziekte voorkomen kan worden en verbetering van de kwaliteit van leven bereikt zou kunnen worden. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld en de behoeften vanuit de patiënten.*
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn weergegeven in onderstaande tabel:

<b>Morele waarden</b>	<b>Belang</b>	<b>Rechtvaardigheid</b>
<b>Belanghebbenden</b>		
<i>Proefdieren in deze proeven (muizen)</i>	<i>Vrijheid, geen pijn en stress ondergaan</i>	<i>Intrinsieke waarde Integriteit Geen instrument zijn</i>
<i>Patiënten</i>	<i>De mogelijkheid om een behandeling tegen verouderingsziekten als ALS en Alzheimer te krijgen</i>	<i>Belangrijke verbetering gezondheid en kwaliteit van leven</i>
<i>Onderzoekers</i>	<i>Onderzoek kunnen doen, publiceren,</i>	<i>Bijdragen kennis aan goede gezondheidszorg</i>
<i>Bedrijf dat therapie maakt</i>	<i>Economisch belang om medicijnen te produceren en te verkopen</i>	<i>Economisch</i>
<i>Publieke en private Fondsen</i>	<i>Willen investeren in veelbelovende projecten die de gezondheid ten goede kunnen komen</i>	<i>Investeren in onderzoek</i>
<i>Samenleving</i>	<i>Gezondheid</i>	<i>Verbeteren kwaliteit van leven, mogelijk verlagen kosten gezondheidszorg</i>

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

*De onderzoekers staan goed aangeschreven en hebben veel kennis op dit gebied en over de diermodellen en de gedragstesten die moeten worden uitgevoerd. Er is zo veel mogelijk uitgevoerd in alternatieve modellen (zonder proefdieren). Ook de vraag van de DEC over het hanteren van dieren is zorgvuldig beantwoord. Onderzoek wordt zoveel mogelijk sequentieel uitgevoerd met heldere beslismomenten voor het vervolg.*

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*Er is een hele heldere opzet beschreven met duidelijke stappen en beslismomenten. De beschreven modellen voor ALS en Alzheimer zijn goed bekend en veel gebruikt in dit type onderzoek. De modellen en de te meten parameters sluiten aan bij het klinisch onderzoek van patiënten waardoor gevonden effecten vertaald kunnen worden naar de kliniek.*

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

*Hoewel men aangeeft zoveel mogelijk beide seksen te gebruiken is niet aangegeven dat bij vechten mannetjes solitair gehuisvest gaan worden.*

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.  
*Men heeft duidelijk en per procedure aangegeven wat het ongerief zal zijn gerelateerd aan de frequentie en ook het ongerief als gevolg van het verouderingsproces is toegelicht. Het cumulatieve ongerief is gebaseerd op de afzonderlijke processen/ handelingen/ testen. Het ongerief van het ALS model is na doorvragen bijgesteld naar ernstig voor een aantal dieren.*
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek, mentaal en gedragsmatig aangetast.  
*Er zijn stammen die spontaan verouderingsziekten ontwikkelen die gepaard gaan met verminderde functionaliteit van spieren of cognitie. De gedragstesten kunnen angst en stress oproepen bij de dieren. Voor bepaald onderzoek moeten dieren via de staart worden gehanteerd, terwijl bekend is dat dit stress oplevert voor de dieren. Bepaalde metingen moeten onder lichte anesthesie worden uitgevoerd (beeldvormende onderzoeken).*
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat.  
*Er zijn heldere criteria die ook goed met de IvD zijn afgestemd. De verwachting is dat een HEP kan worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen, maar het is realistisch dat een klein percentage dieren ondanks de scherpe definities toch ernstig ongerief kan ondergaan gezien de soms snelle ontwikkeling van de ziekte in het ALS model.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.  
*Er is al veel onderzoek verricht naar de werking van nieuwe therapieën in in-vitro modellen, ook in geavanceerde 3D- kweken die bestaan uit meerdere cel types. Maar verouderingsziektes worden veroorzaakt door problemen in verschillende cellen en organen tegelijk. De interacties tussen deze verschillende organen kan vooralsnog alleen goed bestudeerd worden in levende wezens. Het effect van de nieuwe therapieën op verouderingssymptomen zoals geheugenverlies en spierkrachtverlies onderzoeken is nu nog alleen mogelijk in levende wezens. Daarnaast moet farmacokinetiek en farmacodynamiek bestudeerd worden en de potentiële bijeffecten. Dit is niet of nauwelijks te bestuderen in celkweken. Door deze variabelen in muizen te bestuderen, is het veel gerichter mogelijke studies bij patiënten uit te voeren.*
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen.  
*Er worden alleen nieuwe therapieën getest in muizen als ze eerst een bewezen effect hebben in celkweken. Verder worden er eerst experimenten uitgevoerd in een pilot om de juiste proefopzet te bepalen. Hierdoor wordt de uiteindelijke hoeveelheid muizen verminderd. Ook wordt een nieuwe*

*stof eerst in één experiment onderzocht voordat uitgebreidere experimenten worden uitgevoerd. Waar mogelijk worden parameters in tijdslijnen zoveel mogelijk in hetzelfde dier geëvalueerd.*

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

*Dieren worden verdoofd tijdens scans en operaties en krijgen peri-operatieve pijnbestrijding.. Het effect van de verdoving en pijnmedicatie wordt continu geëvalueerd aan de hand van observaties in het gedrag van de dieren na afloop. Behalve door de operaties ondervinden de dieren ongerief door veroudering en de bijbehorende ziektes. Er zijn uitvoerige scorelijsten opgesteld om de symptomen hiervan objectief vast te leggen en om op tijd een humaan eindpunt toe te passen, zodat ernstig ongerief zo veel mogelijk kan worden vermeden. Met hanteren van dieren wordt zoveel mogelijk gebruikgemaakt van diervriendelijke methoden als cup handling of tunnel handling, zodat het oppakken bij de staart tot een minimum kan worden beperkt.*

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, om daarna biologisch materiaal te verzamelen voor verdere analyse. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.

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

*NTS*

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

#### **D. Ethische afweging**

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, *namelijk het onderzoek naar het ontstaan van verouderingsziekten als Alzheimer en ALS door senescente cellen en therapeutische interventie om dit te voorkomen*, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.

2. Er vindt een *aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met voor 2151 muizen mild ongerief, voor 8102 muizen matig ongerief en voor 747 muizen ernstig ongerief, de dieren hebben een reëel belang om geen proefdier te zijn. Onderzoekers hebben duidelijk gemaakt dat pijnbestrijding wordt toegepast waar mogelijk, dat handelingen zoveel mogelijk*

*verfijnd worden uitgevoerd en dat een humaan eindpunt zal worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen, hoewel er wel al sprake kan zijn van ernstig ongerief als dat moet worden toegepast.*

*Hier tegenover staan de belangen van onderzoekers om meer kennis te krijgen en therapie te kunnen ontwikkelen tegen deze ziekten, waar de DEC een reëel belang aan toekent. Dit geldt ook voor de fondsenverstrekkers die dit onderzoek mogelijk maken. De patiënten die aan de beschreven ziekten lijden hebben een essentieel belang bij een therapie die deze processen kunnen stoppen gezien de enorme impact op de kwaliteit van leven voor hen. Aan de belangen van het bedrijf dat de therapie zal ontwikkelen kent de DEC geen waarde toe.*

*Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, zal dit project er toe bijdragen dat er meer kennis verworven wordt over dit type ziekten en de mogelijke therapeutische mogelijkheden, waardoor patiënten behandeld zouden kunnen worden om verdere progressie van de ziekte te voorkomen. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, waarbij de onderzoekers al het mogelijke doen om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.*

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat *het onderzoek naar ontstaan van verouderingsziekten als Alzheimer en ALS door senescente cellen en therapeutische interventie om dit te voorkomen een substantieel belang vertegenwoordigt* en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. De DEC heeft een aantal aspecten uitvoerig besproken.

**Binnen de context:** de DEC is positief gestemd over dat dit onderzoek niet is gericht op levensverlenging ("life span") maar op kwaliteit van gezondheid ("health span").

Het gaat om veel dieren, maar het gaat ook gelden voor een grote patiëntenpopulatie.

De go-no go's en verfijningen die de onderzoekers met de dieren doen n.a.v. de vragen van de commissie (bijvoorbeeld in de handelingen oppakken aan de staart) laten aan de DEC zien hoe de onderzoekers de 3 V's benaderen.

**Buiten de context:** Hier wordt gewerkt aan health span (verbeteren en behouden van gezondheid) versus lifespan (verlengen van leven). Hopelijk kan het model en kunnen de resultaten bijdragen aan species overschrijdende kennis over de pathogenese van andere chronische ziekten (zoals atherosclerose), die zich nu al op jonge leeftijd ongezien ontwikkelen.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD11500202518734

**Bijlagen**

2

Datum 18 februari 2025

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 februari 2025. Het gaat om uw project "Targeting aging pathways to promote healthspan". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202518734. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

18 februari 2025

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202518734

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: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

### Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

### Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

### Over uw aanvraag

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2025  
Geplande einddatum: 28 februari 2030  
Titel project: Targeting aging pathways to promote healthspan  
Titel niet-technische samenvatting: Tegengaan van verouderingsroutes om gezondheid te verbeteren  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 2.034,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:   
Functie:   
Plaats: Utrecht  
Datum: 12 februari 2025



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU -ASC

Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD11500202518734

**Bijlagen**

2

Datum 18 februari 2025

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 februari 2025

Vervaldatum: 20 maart 2025

Factuurnummer: 2518734

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202518734	€ 2.034,00

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

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**To:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#); [UBD.FCA.ASC.Factuur](#)  
**Cc:** [REDACTED] [dec-utrecht@umcutrecht.nl](mailto:dec-utrecht@umcutrecht.nl)  
**Subject:** Aanhouden AVD11500202518734  
**Date:** donderdag 10 april 2025 11:59:54

---

**CAUTION:** This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 16-02-2025 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting aging pathways to promote healthspan" met aanvraagnummer AVD11500202518734. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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**

- U geeft aan, onder 'Fate of the animals', dat de dieren zullen worden gedood. Kunt hier verduidelijken waarom de dieren gedood zullen worden?
- In uw NTS onder de kop 'Expected impacts' gebruikt u de term 'mild'. Kunt u deze term aanpassen naar de Nederlandse wettelijke benaming "licht"?
- U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

### **Onduidelijkheden**

- In bijlage dierproeven 2 in onderdeel F. geeft u aan hoeveel dieren er in iedere ongeriefclassificatie wordt verwacht. De som van deze aantallen komt uit op 5079, en niet op de 5080 dieren die u in onderdeel B benoemt. Kunt u deze aantallen controleren en waar nodig aanpassen?
- De formule die u bij bijlage dierproeven 2 onder F. gebruikt om het aantal dieren met licht en matig ongerief te berekenen is niet voldoende helder voor de CCD. Kunt u aangeven waar het getal 1673 vandaan komt?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

### **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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven



[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

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.

**PER E-MAIL**

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 93118  
2509 AC  
Den Haag

**Datum** 18 april 2025  
**Betreft** Antwoorden op vragen  
**Ons kenmerk** AVD11500202518734  
**Uw kenmerk** Typ uw kenmerk.

Typ directienaam

**Typ afdeling**Typ naam  
Typ functieTel [000] 000 00 00  
E-mailadres

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Op 16-02-2025 hebben wij bij u een CCD verunningaanvraag ingediend met code AVD11500202518734 en de titel " Targeting aging pathways to promote healthspan". Op 10-04-2025 heeft u ons hierover enkele vragen gesteld. Bij deze willen wij graag van de gelegenheid gebruik maken deze te beantwoorden. Het gaat om de volgende vragen, met onze antwoorden in het blauw:

**Niet technische samenvatting**

- U geeft aan, onder 'Fate of the animals', dat de dieren zullen worden gedood. Kunt hier verduidelijken waarom de dieren gedood zullen worden?

[Antwoord] U heeft gevraagd om een verduidelijking waarom de dieren worden gedood. Deze toelichting is nu opgenomen in de NTS. De dieren worden gedood omdat we de organen nodig hebben voor nadere analyse. Zo onderzoeken we onder andere of de geteste stoffen daadwerkelijk schadelijke senescente cellen hebben verwijderd en of de organen hierdoor een gezonder histologisch beeld vertonen.

In uw NTS onder de kop 'Expected impacts' gebruikt u de term 'mild'. Kunt u deze term aanpassen naar de Nederlandse wettelijke benaming "licht"?

[Antwoord] De term 'mild' onder het kopje 'Expected impacts' is aangepast naar de wettelijk correcte Nederlandse benaming 'licht'.

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

[Antwoord] De herziene NTS is nu ingediend in het daarvoor bestemde Excel-formulier, zoals door u verzocht.

In bijlage dierproeven 2 in onderdeel F. geeft u aan hoeveel dieren er in iedere ongeriefclassificatie wordt verwacht. De som van deze aantallen komt uit op 5079, en

Bezoekadres:  
Heidelberglaan 100  
3584 CX UtrechtPostadres:  
Huispostnummer Huispostnr.  
Kamernummer Kamernr.  
Postbus 85500  
3508 GA Utrecht

niet op de 5080 dieren die u in onderdeel B benoemt. Kunt u deze aantallen controleren en waar nodig aanpassen?

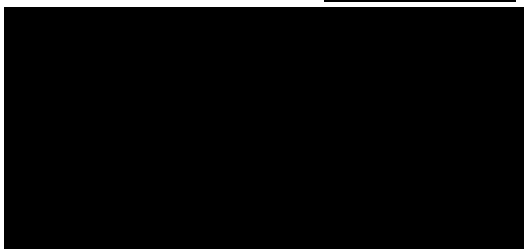
[Antwoord] Er was een afrondingsfout waardoor het totaal in onderdeel F. van bijlage dierproeven 2 uitkwam op 5079 in plaats van 5080 zoals vermeld in onderdeel B. Dit is gecontroleerd en gecorrigeerd, zodat beide onderdelen nu overeenkomen.

De formule die u bij bijlage dierproeven 2 onder F. gebruikt om het aantal dieren met licht en matig ongerief te berekenen is niet voldoende helder voor de CCD. Kunt u aangeven waar het getal 1673 vandaan komt?

[Antwoord] We hebben verduidelijkt waar het getal 1673 vandaan komt. In onze studie maken we gebruik van drie verschillende senescentie-modellen (damage-induced, diet-induced en engraftment). We gaan hierbij uit van een gelijke verdeling van het aantal dieren over de drie modellen. Van het totale aantal experimentele dieren (exclusief trainingsdieren), namelijk 5020, komt 1/3 overeen met 1673,3 dieren. Deze toelichting is nu opgenomen in bijlage dierproeven 2 onder F.

Wij hopen u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben en zien uw verdere beoordeling met belangstelling tegemoet.

Hoogachtend, ook namens  uit ons lab





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD11500202518734

**Bijlagen**

3

Datum 1 mei 2025

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 16 februari 2025 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting aging pathways to promote healthspan" met aanvraagnummer AVD11500202518734. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 mei 2025 tot en met 30 april 2030.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2031 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

## **Procedure**

**Datum:**

1 mei 2025

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202518734

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 31 maart 2025. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 10 april 2025 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op aanpassingen in de niet-technische samenvatting en onduidelijkheden omtrent de aantallen dieren. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## **Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat De gewenste startdatum ligt in het verleden. De aansluitende einddatum is, zoals aangegeven in het aanvraagformulier, daarom aangepast.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2031 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## **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 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen

bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

**Datum:**

1 mei 2025

**Aanvraagnummer:**

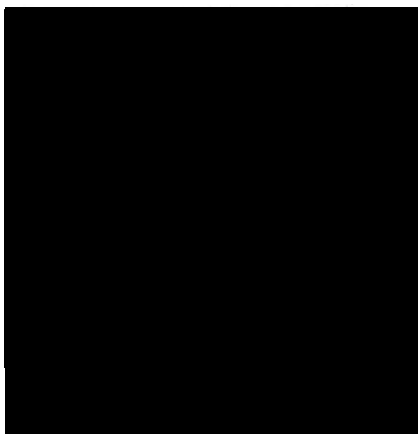
AVD11500202518734

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 vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2025 tot en met 30 april 2030, voor het project "Targeting aging pathways to promote healthspan" met aanvraagnummer AVD11500202518734, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Labmanager verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 16 februari 2025
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 22 april 2025;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. Analysis of novel compounds in aging models, zoals ontvangen op 22 april 2025;
    - 3.4.3.2. Analysis of novel compounds in senescence-induction models, zoals ontvangen op 22 april 2025;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 22 april 2025;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 31 maart 2025
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 22 april 2025.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1. Analysis of novel compounds in aging models</b>			
	Muizen (Mus musculus)	5.920	8,0% Ernstig 92,0% Matig
<b>3.4.3.2. Analysis of novel compounds in senescence-induction models</b>			
	Muizen (Mus musculus)	5.080	5,0% Ernstig 53,0% Matig 42,0% Licht

### Voorwaarden

#### Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project

**Aanvraagnummer:** AVD11500202518734

te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2031 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

**Geldende voorschriften**

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**

AVD11500202518734

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

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

In artikel 9 van de wet 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD11500202518734

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.

Volgens artikel 13b van de wet 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 van de wet 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 van de wet 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.

### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.