

	Dossier: AVD11500202417856	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Stamcellen van het oor ter bevordering van herstel van het gehoor van slechthorende patiënten
NTS-identificatiecode	NTS-NL-835582 v.1, 22-04-2024
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Vernieuwing van haarcellen Stamcellen
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren) Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van zintuigorganen (huid, ogen en oren) bij 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>In het oor zijn de haarcellen de belangrijke cellen die we nodig hebben om te kunnen horen. De cellen worden zo genoemd vanwege de haartjes (cilia) op de cel. Slechthorendheid wordt vaak veroorzaakt door schade aan de haarcellen en verlies ervan. Het doel van dit voorstel is om vernieuwing van die haarcellen mogelijk te maken in slechthorende patiënten door gunstige omstandigheden te maken voor stamcellen die van nature aanwezig zijn in de zintuigen.</p> <p>De aanvraag betreft herstel van het gehoor na ernstig gehoorverlies. Er zijn allerlei oorzaken die kunnen leiden tot gehoorverlies en doofheid zoals erfelijke aanleg, infecties, geneesmiddelen met schadelijke bijwerkingen voor het gehoor (bepaalde antibiotica en chemotherapie) en veel blootstelling aan harde geluiden. De effecten van deze verschillende oorzaken op het vermogen van het gehoororgaan om nieuwe haarcellen te maken, en op die manier het gehoor te herstellen, zijn nauwelijks onderzocht. Schade aan de haarcellen, bijvoorbeeld geknakte of verwarde haartjes, leidt tot gehoorverlies, en verlies van haarcellen leidt tot ernstig gehoorverlies. Omdat de grote meerderheid van ernstig gehoorverlies bij volwassenen voorkomt, is het cruciaal dat vermogen tot vernieuwing (ook wel regeneratie genoemd) van haarcellen te onderzoeken in volwassen proefdieren. Bij dit onderzoek in zoogdieren wordt kennis gebruikt die is verkregen uit onderzoek naar de ontwikkeling van het gehoororgaan bij zoogdieren en vernieuwing van haarcellen bij gewervelde diersoorten anders dan zoogdieren (bijvoorbeeld vogels). Op die manier kunnen we stoffen vinden die optimaal zijn voor het bevorderen van vernieuwing. In het hier voorgestelde onderzoek richten we ons op de stamcellen in het gehoororgaan om vernieuwing van haarcellen en daarmee herstel van gehoor te bevorderen na ernstig haarcelverlies. In de proefdieren beschadigen we de haarcellen door de dieren bloot te stellen aan geneesmiddelen met ernstige bijwerkingen of lawaai.</p>
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 het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Korte termijn</p> <p>Het doel van het onderzoek is om herstel van gehoor mogelijk te maken na verlies ervan in experimenten in zowel weefselkweken als in proefdieren. Om weefselkweken te maken nemen we zintuigweefsel van het gehoororgaan, het slakkenhuis van volwassen muizen (met normaal of aangedaan gehoor) en maken er zogenaamde organoïden van, die mogelijk haarcellen kunnen maken. Organoïden zijn 3-dimensionale stamcelkweken die van verschillende soorten weefsel en organen afgeleid kunnen worden en die cellen produceren die voor het onderzoek bestudeerd kunnen worden, in ons geval dus haarcellen. De organoïden van het slakkenhuis (ook cochlea genoemd) zijn cochleaire organoïden, die we willen gebruiken om stoffen te testen op het bevorderen van vernieuwing van haarcellen.</p> <p>Lange termijn</p> <p>Het doel van het onderzoek is om herstel van gehoor mogelijk te maken na verlies ervan waarbij we gebruik maken van stamcellen die van nature aanwezig zijn in het zintuigweefsel. We gaan stoffen testen waarvan we weten dat ze een rol spelen bij weefselvernieuwing, en we onderzoeken het effect</p>

van die stoffen op vernieuwing van de haarcellen van het oor na opgewekt gehoorverlies. Veel van de stoffen die we testen in het onderzoek worden al gebruikt in patiënten voor andere aandoeningen en zijn dus veilig te gebruiken. Als ons onderzoek goede resultaten oplevert en herstel van de hoorfunctie laat zien in de proefdieren, kunnen we vervolgen met klinische studies om te onderzoeken of gehoor ook in patiënten hersteld kan worden.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Meten van gehoorfunctie: elektrische signalen van de gehoorzenuw (vergelijkbaar met EEG) worden gemeten in reactie op korte klik- en piepgeluiden (Auditory Brainstem Responses, ABRs) om de gehoorfunctie te bepalen. De muizen worden daarvoor verdoofd en drie naalden om de ABR mee te meten (zogenaamde elektroden) worden in de huid aangebracht (achter de oorschelp, op het hoofd en in de achterpoot). De duur van de metingen is 15 tot 30 minuten. De ABR-metingen worden tijdens de duur van het experiment drie keer uitgevoerd.

Aanbrengen van gehoorverlies ('doof maken'): het gehoor wordt beschadigd door de dieren bloot te stellen aan medicatie met voor het gehoor nadelige bijwerkingen ('ototoxisch') of aan zeer harde geluiden. De procedure is eenmalig en het gehoorverlies zal permanent zijn. Het welzijn wordt in de eerste drie dagen geobserveerd, omdat gewichtsverlies kortdurend kan optreden (in geval van de ototoxische medicatie) en de dieren moeten wennen aan de nieuwe conditie met ernstig gehoorverlies en eventueel oorsuizen.

- Ototoxische medicatie: na de ABR-metingen wordt de medicatie toegediend terwijl de dieren onder verdoving blijven. Het antibioticum kanamycine wordt onderhuids toegediend en daarna wordt het plasmiddel furosemide via de ader toegediend. Aangezien furosemide een plasmiddel is, verliezen de dieren veel vocht en is er vaak gewichtsverlies in de eerste drie dagen. Om die reden meten we in die dagen dagelijks het gewicht en houden we het welzijn in de gaten door te kijken naar de vacht en naar het gedrag. Zeer zelden overlijdt het dier door de combinatie van kanamycine en furosemide.
- Lawaai: terwijl de dieren onder lichte verdoving zijn, worden ze blootgesteld aan zeer harde geluiden (~120 dB SPL) gedurende twee uur.

Lokale toediening van stoffen in het slakkenhuis: stoffen die geschikt lijken om vernieuwing van haarcellen te bevorderen, worden met een kleine naald in het slakkenhuis aangebracht tijdens een operatie onder verdoving. We doen dit drie tot veertien dagen na het doof maken. Na de operatie worden de dieren zeven dagen dagelijks geobserveerd en wordt pijnstilling gegeven tot in elk geval de operatiewond is genezen.

Algemeen

Doding: de dieren worden gedood door ze te plaatsen in een CO₂-hok, waardoor ze stikken door zuurstofgebrek.

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?

Gehoorverlies: het doof maken met de geneesmiddelen kanamycine en furosemide kan tot vocht- en gewichtsverlies leiden, omdat furosemide een plasmiddel is. Om die reden wordt in de eerste drie dagen dagelijks het gewicht gemeten en het welzijn in de gaten gehouden. Zeer zelden (< 5%) overlijdt het dier door de combinatie van kanamycine en furosemide. Stress kan optreden wegens het gehoorverlies en daarbij vaak optredend oorsuizen. Het ongerief wordt ingeschat op matig.

Lokale toediening van stoffen in het slakkenhuis: de operatie waarbij de stoffen worden toegediend in het slakkenhuis vindt plaats onder verdoving. De dieren kunnen na de operatie pijn ondervinden als gevolg van de wond. De dieren krijgen pijnstillende medicatie. Het ongerief wordt ingeschat op matig.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1234	0	375	857	2

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:

Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren

Hergebruikt

Teruggeplaatst

Geadopteerd

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Bij alle dieren zullen we de binnenoren met slakkenhuis verwijderen voor verdere analyses. Bij deze procedure worden de dieren gedood.

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.

Alternatieven bestaan uit cochleaire organoïden zoals boven beschreven. We onderzoeken in dit project in welke mate de organoïden van zintuigweefsel (van muis en mens) geschikt zijn als model voor vernieuwing van haarcellen. We kunnen met deze organoïden onderzoeken hoeveel haarcellen geregenereerd worden (afhankelijk van de stoffen waarmee we de organoïden behandelen). Maar we kunnen met de organoïden niet onderzoeken hoe de nieuwe haarcellen functioneren in een intact slakkenhuis en in hoeverre het gehoor verbetert. We hebben daarvoor het hele auditief systeem nodig, met slakkenhuis, gehoorzenuw en hersenstam, en dus hebben we de proefdieren nodig.

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.

Alternatieven bestaan uit cochleaire organoïden zoals boven beschreven. We onderzoeken in dit project in welke mate de organoïden van zintuigweefsel (van muis en mens) geschikt zijn als model voor vernieuwing van haarcellen. We kunnen met deze organoïden onderzoeken hoeveel haarcellen geregenereerd worden (afhankelijk van de stoffen waarmee we de organoïden behandelen). Maar we kunnen met de organoïden niet onderzoeken hoe de nieuwe haarcellen functioneren in een intact slakkenhuis en in hoeverre het gehoor verbetert. We hebben daarvoor het hele auditief systeem nodig, met slakkenhuis, gehoorzenuw en hersenstam, en dus hebben we de proefdieren nodig.

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 hebben veel ervaring in procedures die we in het voorgestelde onderzoek beschrijven: a) doofmaakprocedures bij muizen met behulp van kanamycine en furosemide, en b) operaties om plaatselijk stoffen toe te dienen. De dieren zullen goed geobserveerd worden zoals boven beschreven, en we hebben een uitstekend team dierversorgers beschikbaar om hierbij te helpen, wat het dierenwelzijn ten goede komt. De dieren krijgen pijnmedicatie waar nodig. In geval van ernstige bijwerkingen, infecties, en/of gewichtsverlies ten gevolge van injecties en behandelingen, zullen de dieren gedood worden om verder lijden te voorkomen.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Soort
We gebruiken muizen om de volgende redenen. 1) Er bestaan muizen die zodanig gefokt zijn, dat we de stamcellen waarin we geïnteresseerd zijn, kunnen opsporen. Alternatieven met stoffen in gewone muizen zijn niet voorhanden. 2) Bij muizen kunnen we gehoorverlies aanbrengen zoals dat veel voorkomt bij mensen, namelijk veroorzaakt door medicatie met ernstige bijwerkingen of lawaai. 3) We hebben ruime ervaring met gehooronderzoek bij muizen inclusief de genetisch gemodificeerde varianten.

Levensstadia

We zijn geïnteresseerd in de leeftijd-afhankelijkheid van het vermogen om haarcellen te vernieuwen in het oor bij de volwassen muis. We willen weten bij welke leeftijd in volwassenheid een therapie

gebaseerd op vernieuwing van haarcellen het beste werkt. De reden hiervoor is dat de meerderheid van mensen met gehoorverlies volwassen is, en deze aandoening toeneemt met het ouder worden.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	01-01-2030
Reden voor de beoordeling achteraf	
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	
--	--



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of 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 de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	n.v.t.
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80125 3508TC UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Post-doc
		Afdeling	KNO-heelkunde
		Telefoonnummer	

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	assistent professor
		Afdeling	KNO-heelkunde
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> 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.	Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	KNO-arts
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Afdeling	KNO-heelkunde
		Telefoonnummer	[REDACTED]
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
		<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <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 hier onder 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 geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3	
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder 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	1 - 3 - 2024
		Einddatum (t/m)	1 - 1 - 2029
3.2	Wat is de titel van het project?	Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Stamcellen van oor ter bevordering van herstel van de zintuigen in patiënten met gehoorverlies.	
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 type="checkbox"/>

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	1 - 2 - 2024
Handtekening	[Redacted]



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).
- 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.	Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients.

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.

Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients

Regeneration of LGR5-positive inner ear progenitors for the treatment of sensorineural hearing loss

Hearing loss

Hearing loss is the most frequent sensory deficit in humans and is mainly caused by irreversible damage to cochlear sensory cells (hair cells) and/or their associated neurons (spiral ganglion neurons, SGNs). Irreversible hair cell loss is particularly caused by aging, noise exposure and ototoxic medication. In 2019, there were approximately 460 million individuals with disabling hearing loss, and according to the WHO, this number might increase to more than 900 million individuals by 2050 (GBD 2019 Hearing Loss Collaborators, 2021). Hearing loss, which is often accompanied by tinnitus, results in high levels of morbidity, depression and social isolation, and it has been shown to significantly contribute to cognitive decline in the elderly (Cosh et al., 2019; Kramer et al., 2002; Lin et al., 2013). While hearing aids and cochlear implants restore hearing in hearing-impaired and deaf individuals to a large extent, sounds are still perceived as distorted because the original cochlear function—in which the hair cells together with the basilar membrane play a key role—is not replaced.

Regeneration of lost cochlear cells has potential as an alternative approach and can have significant clinical applications to restore hearing without the need for an electronic device.

Endogenous Progenitor Cells in the Mammalian Cochlea

Studies on the regeneration of the avian cochlea or zebrafish lateral line have demonstrated spontaneous hair cell regeneration out of endogenous progenitor cells after damage, even in adult specimens (Bermingham-McDonogh and Rubel, 2003; Brignull et al., 2009). In these species, the Wnt, Notch, Sonic hedgehog (Shh), fibroblast growth factor (FGF) and bone morphogenetic proteins (BMP)/transforming growth factor β (TGF β) signaling pathways control hair cell regeneration. In contrast, the mammalian adult inner ear possesses limited regenerative potential (Matsui and Cotanche, 2004; Taylor et al., 2012). The vestibular organ shows scarce but spontaneous hair cell regeneration after damage, whereas the cochlea shows no spontaneous regeneration (Burns and Stone, 2017). For non-genetic hearing loss, **targeting the endogenous cochlear progenitor cells by manipulating signaling pathways to promote hair cell renewal might improve the regenerative capacity.**

We have previously demonstrated (with experiments performed under license AVD1150020186105) that the neonatal and adult normal hearing mouse cochlea has supporting cells that act as endogenous progenitor cells and express the stem cell markers Lgr4, Lgr5, and Lgr6 (Zak, 2016; Smith-Cortinez, 2021, 2023a). We have also demonstrated that Lgr5+ supporting cells survive 7- and 28-days after severe ototoxic deafening (Smith-Cortinez, 2021, 2023a).

Because the majority of patients with sensorineural hearing loss (SNHL) are adults, studying the regenerative capacity after hair cell loss in the adult mammalian cochlea is the key to understanding its true therapeutic potential.

An overview of the organization of the adult cochlea and the markers of supporting cells with stem cell properties shown schematically in **Figure 1** (reviewed by Smith-Cortinez et al., 2023b).

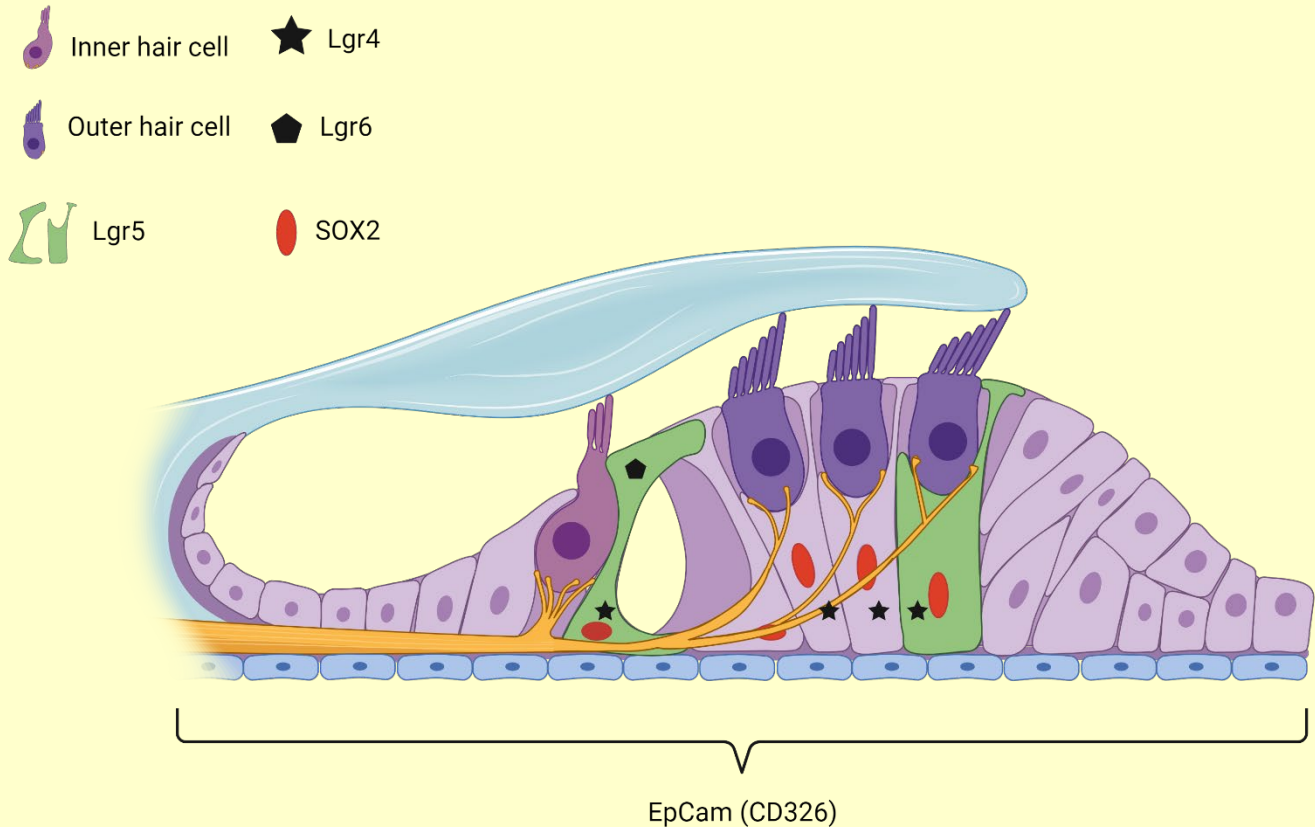


Figure 1. Expression of important supporting cell markers for regeneration in the adult cochlea. Lgr5-positive supporting cells (SC) indicated in green and SOX2-positive SC in red (nucleus). EpCam is expressed in all SCs in the adult cochlea (Smith-Cortinez et al., 2023b).

Although these studies suggest the availability of endogenous cochlear progenitor cells as targets for treatments, even after trauma, it was not determined if the surviving supporting cells had any progenitor capacity (e.g., by evaluating if surviving supporting cells could produce hair cells *in vitro*). This proposal **aims to investigate whether and to what extent surviving supporting cells, including Lgr5+ cells, maintain regenerative potential.**

Epigenetic modifications during the development of the cochlea promote gene transcription associated with regeneration in neonatal stages; however, repressive complexes limit cochlear regeneration in adulthood (Deng and Hu, 2020; Iyer et al., 2022; Mittal et al., 2020; Tao et al., 2021). Histone modifications and DNA methylations are the main epigenetic modifications controlling the access of transcription factors to chromatin. In Lgr5+ inner ear stem cells, modifications in histone H3K4me regulate proliferation and hair cell regeneration after neomycin treatment (Ma et al., 2022). Interestingly, inhibition of histone deacetylases (HDAC) with valproic acid (VPA) has been shown to promote hair cell differentiation *in vitro* (McLean et al., 2017). In addition, inhibition of DNA methylation (with 5-azacytidine) has been shown to promote hair cell differentiation in Sox2+ supporting cells in adult mice (Deng and Hu, 2020). Lastly, inhibition of demethylation in histone H3K4me (with GSK-LSD1) significantly increased the number of supporting cells that transdifferentiated to hair cells (Tao et al., 2021). Thus, **breaking the epigenetic barriers of the endogenous cochlear stem cells might be the key to improving hair cell regeneration in the adult cochlea.**

Promoting Regeneration & Re-Innervation

Important signaling pathways (Wnt, Notch, Shh, FGF, BMP/TGF β) in the zebrafish lateral line and in the avian cochlea have been described to participate in hair cell regeneration, and these same pathways are known to control otic development in the mammalian cochlea. For that reason, in the last decade, novel strategies have focused on targeting these signaling pathways in the mammalian cochlea to improve hair cell regeneration (Waqas et al., 2016; Zak et al., 2015).

Novel combinational strategies targeting endogenous progenitor cells, such as Lgr5+ cells, have shown promising results (Waqas et al., 2016; Zak et al., 2015) in promoting hair cell regeneration in vitro.

These observations suggest that manipulating a combination of key signaling pathways to target endogenous cochlear progenitors, including epigenetic manipulation, is a potential therapeutic approach for hearing loss in adults. Unfortunately, this has mainly been investigated in the neonatal cochlea or ex vivo and the functional effects are still unknown. For that reason, here we aim to study the functional effect of these drugs in vivo using the Lgr5GFP animal models after testing the combination of drugs using an in vitro model of cochlear organoids.

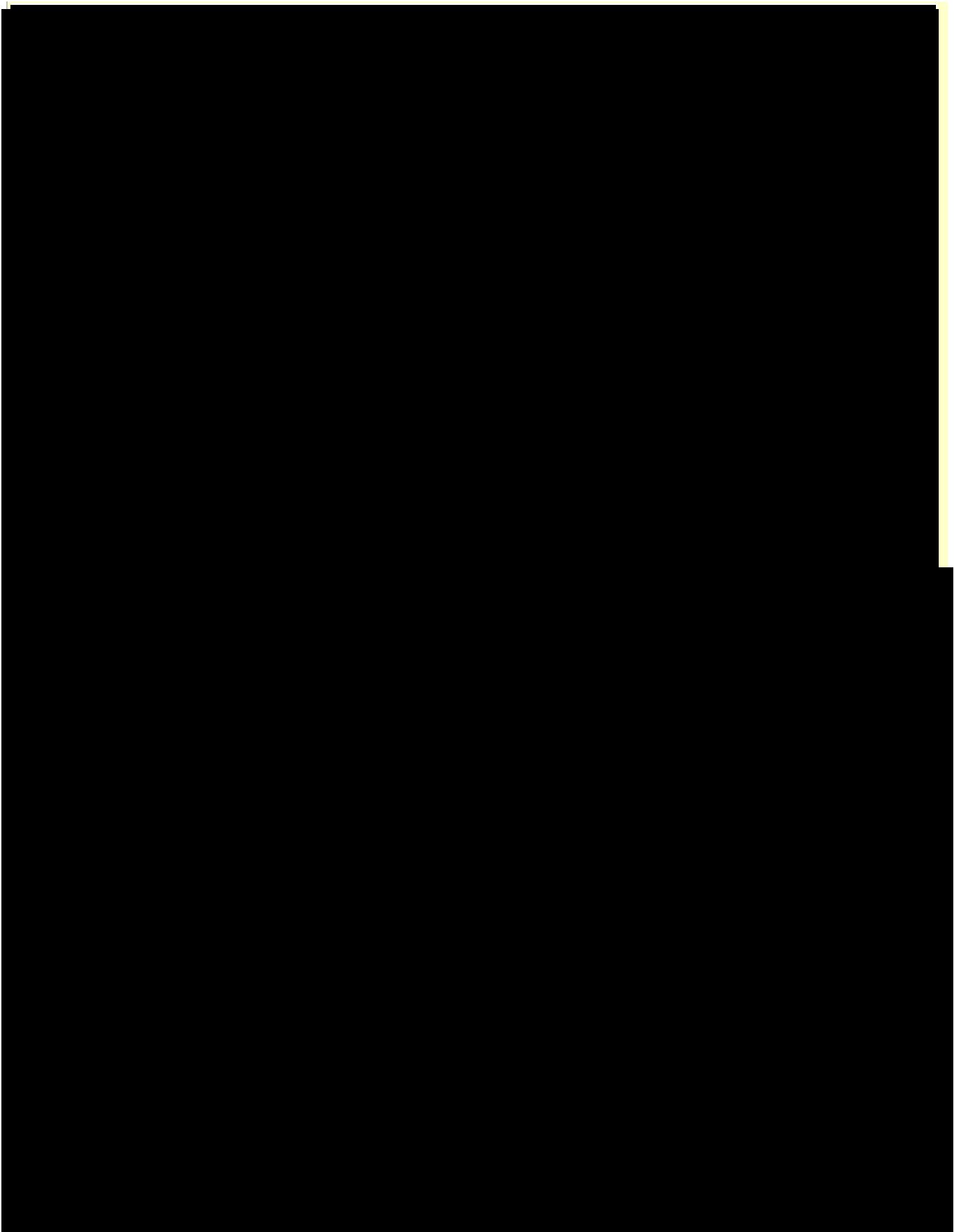
We aim to determine whether and to what extent adult Lgr5+ supporting cells or other supporting cells with progenitor capacity retain responsiveness to Wnt activation, Notch inhibition and/or to the manipulation of other signaling pathways (Shh, FGF, BMP/TGF β) after deafening to improve supporting cell proliferation and hair cell regeneration.

Improving Functional Outcomes: Hair Cell Re-Innervation after Cochlear Trauma

To improve the restoration of hearing in deafened patients, re-innervation of newly generated hair cells and re-formation of lost synaptic connections, known as ribbon synapses, are necessary. Protection of SGNs by neurotrophins after cochlear damage has been widely studied (also by our research group). The four types of neurotrophins nerve growth factor (NGF), BDNF, NT-3, and NT-4/5 participate during cochlear development, and exogenous treatment has been shown to ameliorate SGN loss and improve the number of ribbon synapses after cochlear damage in animal studies. **The additional value of adding neurotrophins to the regenerative treatments targeting endogenous cochlear progenitor cells on functional outcomes will be further explored here.** By focusing the efforts on a multi-targeted approach, the chances of restoring hearing after cochlear damage are potentially higher, giving the patients a better opportunity for recovery.

Human hair cell regeneration and clinical trials targeting endogenous stem cells

In humans, there is little evidence of hair cell regeneration in the inner ear. However, three-dimensional cultures have allowed the expansion and experimentation of human-derived cochlear progenitor cells as inner ear organoids. Recently, it has been shown that fetal-derived post-mitotic EpCAM+ cells and cells isolated from adult human inner ear (cochlea and vestibular organ) are able to proliferate, expand and generate hair cells in vitro after differentiation with a Wnt activator and a γ -secretase (Notch) inhibitor (McLean et al., 2017; Roccio et al., 2018; Senn et al., 2020). It has also been shown that endogenous progenitor cells from the inner ear express Lgr5 (Roccio et al., 2018; van der Valk et al., 2023; Yu et al., 2019).





In this proposal we aim to answer the following question in an animal experiment:

Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells (in vitro) thereby improving hearing (in vivo) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?

We aim to answer the following Sub questions:

- 1) Do LGR5+ supporting cells have regenerative capacity after deafening or age-related hearing loss?
- 2) Are all de novo produced hair cells derived from LGR5+ supporting cells?

References

- Bermingham-McDonogh, O., and Rubel, E.W. (2003). Hair cell regeneration: winging our way towards a sound future. *Curr Opin Neurobiol* *13*, 119-126.
- Brignull, H.R., Raible, D.W., and Stone, J.S. (2009). Feathers and fins: non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain Res* *1277*, 12-23.
- Burns, J.C., and Stone, J.S. (2017). Development and regeneration of vestibular hair cells in mammals. *Semin Cell Dev Biol* *65*, 96-105.
- Cosh, S., Helmer, C., Delcourt, C., Robins, T.G., and Tully, P.J. (2019). Depression in elderly patients with hearing loss: current perspectives. *Clin Interv Aging* *14*, 1471-1480.
- Deng, X., and Hu, Z. (2020). Generation of Cochlear Hair Cells from Sox2 Positive Supporting Cells via DNA Demethylation. *Int J Mol Sci* *21*, 1-9.
- GBD 2019 Hearing Loss Collaborators (2021). Hearing loss prevalence and years lived with disability, 1990-2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* *397*, 996-1009.
- Iyer, A.A., Hosamani, I., Nguyen, J.D., Cai, T., Singh, S., McGovern, M.M., Beyer, L., Zhang, H., Jen, H.I., Yousaf, R., *et al.* (2022). Cellular reprogramming with ATOH1, GF11, and POU4F3 implicate epigenetic changes and cell-cell signaling as obstacles to hair cell regeneration in mature mammals. *Elife* *11*, 2022.2005.2003.490440.
- Kramer, S.E., Kapteyn, T.S., Kuik, D.J., and Deeg, D.J. (2002). The association of hearing impairment and chronic diseases with psychosocial health status in older age. *J Aging Health* *14*, 122-137.
- Leung, C., Tan, S.H., and Barker, N. (2018). Recent Advances in Lgr5(+) Stem Cell Research. *Trends Cell Biol* *28*, 380-391.
- Lin, F.R., Yaffe, K., Xia, J., Xue, Q.L., Harris, T.B., Purchase-Helzner, E., Satterfield, S., Ayonayon, H.N., Ferrucci, L., Simonsick, E.M., *et al.* (2013). Hearing loss and cognitive decline in older adults. *JAMA Intern Med* *173*, 293-299.
- Ma, X., Zhang, S., Qin, S., Guo, J., Yuan, J., Qiang, R., Zhou, S., Cao, W., Yang, J., Ma, F., *et al.* (2022). Transcriptomic and epigenomic analyses explore the potential role of H3K4me3 in neomycin-induced cochlear Lgr5+ progenitor cell regeneration of hair cells. *Hum Cell* *35*, 1030-1044.
- Matsui, J.I., and Cotanche, D.A. (2004). Sensory hair cell death and regeneration: two halves of the same equation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* *12*, 418-425.
- McLean, W.J., Yin, X., Lu, L., Lenz, D.R., McLean, D., Langer, R., Karp, J.M., and Edge, A.S.B. (2017). Clonal Expansion of Lgr5-Positive Cells from Mammalian Cochlea and High-Purity Generation of Sensory Hair Cells. *Cell Rep* *18*, 1917-1929.
- Mittal, R., Bencie, N., Liu, G., Eshraghi, N., Nisenbaum, E., Blanton, S.H., Yan, D., Mittal, J., Dinh, C.T., Young, J.I., *et al.* (2020). Recent advancements in understanding the role of epigenetics in the auditory system. *Gene* *761*, 144996.
- Roccio, M., Perny, M., Ealy, M., Widmer, H.R., Heller, S., and Senn, P. (2018). Molecular characterization and prospective isolation of human fetal cochlear hair cell progenitors. *Nat Commun* *9*, 4027.

Senn, P., Mina, A., Volkenstein, S., Kranebitter, V., Oshima, K., and Heller, S. (2020). Progenitor Cells from the Adult Human Inner Ear. *Anat Rec (Hoboken)* 303, 461-470.

Smith-Cortinez, N., Hendriksen, F.G.J., Ramekers, D., Stokroos, R.J., Versnel, H., and Straatman, L.V. (2023a). Long-term survival of LGR5 expressing supporting cells after severe ototoxic trauma in the adult mouse cochlea. *Front Cell Neurosci* 17, 1236894.

Smith-Cortinez, N., Tan, A.K., Stokroos, R.J., Versnel, H., and Straatman, L.V. (2023b). Regeneration of Hair Cells from Endogenous Otic Progenitors in the Adult Mammalian Cochlea: Understanding Its Origins and Future Directions. *Int J Mol Sci* 24, 7840.

Smith-Cortinez, N., Yadak, R., Hendriksen, F.G.J., Sanders, E., Ramekers, D., Stokroos, R.J., Versnel, H., and Straatman, L.V. (2021). LGR5-Positive Supporting Cells Survive Ototoxic Trauma in the Adult Mouse Cochlea. *Front Mol Neurosci* 14, 729625.

Tao, L., Yu, H.V., Llamas, J., Trecek, T., Wang, X., Stojanova, Z., Groves, A.K., and Segil, N. (2021). Enhancer decommissioning imposes an epigenetic barrier to sensory hair cell regeneration. *Dev Cell* 56, 2471-2485 e2475.

Taylor, R.R., Jagger, D.J., and Forge, A. (2012). Defining the cellular environment in the organ of Corti following extensive hair cell loss: a basis for future sensory cell replacement in the Cochlea. *PLoS One* 7, e30577.

van der Valk, W.H., van Beelen, E.S.A., Steinhart, M.R., Nist-Lund, C., Osorio, D., de Groot, J., Sun, L., van Benthem, P.P.G., Koehler, K.R., and Locher, H. (2023). A single-cell level comparison of human inner ear organoids with the human cochlea and vestibular organs. *Cell Rep* 42, 112623.

Waqas, M., Zhang, S., He, Z., Tang, M., and Chai, R. (2016). Role of Wnt and Notch signaling in regulating hair cell regeneration in the cochlea. *Front Med* 10, 237-249.

Yu, K.S., Frumm, S.M., Park, J.S., Lee, K., Wong, D.M., Byrnes, L., Knox, S.M., Sneddon, J.B., and Tward, A.D. (2019). Development of the Mouse and Human Cochlea at Single Cell Resolution. *bioRxiv*, 739680.

Zak, M., Klis, S.F., and Grolman, W. (2015). The Wnt and Notch signalling pathways in the developing cochlea: Formation of hair cells and induction of regenerative potential. *Int J Dev Neurosci* 47, 247-258.

Zak, M., van Oort, T., Hendriksen, F.G., Garcia, M.I., Vassart, G., and Grolman, W. (2016). LGR4 and LGR5 Regulate Hair Cell Differentiation in the Sensory Epithelium of the Developing Mouse Cochlea. *Front Cell Neurosci* 10, 186.

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

Aims

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Immediate goals

We aim to gain better knowledge about the LGR5+ supporting cells and their contribution to hair cell regeneration capacity *in vitro* and *in vivo* after ototoxicity, noise-induced trauma, or age-related hearing loss

and correlate this data to the translational in vitro project on human inner ear regeneration we are currently leading. We aim to select a combination of drugs that promote hair cell regeneration in vitro and can improve hearing performance in mice.

Ultimate goals

The ultimate goal is to promote sensory regeneration in patients with hearing deficits by targeting the endogenous stem cells found in the inner ear.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

After numerous studies with guinea pigs, and wild type and Lgr5-GFP transgenic mice in our recent CCD licenses (AVD1150020174315 and AVD1150020186105), our research group has ample experience with the surgical procedures, electrophysiological measurements, histological and molecular analysis (e.g., mouse studies) and cell culture in the form of organoids. The funding for the animal experiments has been arranged via the Heinsius Houbolt Fonds (a yearly grant we receive); and the human inner ear regeneration study has been partially subsidized by a NWO Open Science Competition XS grant obtained by the lead applicant. Besides the applicant is applying to other (national and international) grants. With the combined expertise of the group; clinical expertise, the expertise in electrophysiology and hearing and the cellular and molecular expertise this project is set to success. We have strong national and international collaborations that will allow us to complete this project.

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?

Social and scientific impact

Sensory deficits affect the quality of life of patients; more than 5% of the world's population suffers from significant disabling hearing loss (usually acquired through life by exposure to ototoxic medication, noise-exposure or age-related causes) We aim to promote regeneration and sensory recovery in these patient-populations.

Hearing aids and cochlear implants can relief the symptoms of hearing impaired individuals but only to a certain extent. Promoting regeneration of hair cells from endogenous progenitor cells in the cochlea of hearing-impaired patients could be a novel approach. In a national study conducted by RIVM among adult hearing impaired people and parents of children with hearing problems, regeneration of hair cells became an absolute research priority mentioned by the respondents. The current study will not only contribute to finding a treatment for deafness and hearing impairment, but also to raise the general scientific knowledge to the function of the Lgr5 receptors in pathological situations (after ototoxic insult and after noise trauma). This knowledge will contribute to optimizing a possible treatment for deafness and hearing impairment in patients. One of the group members participates as an active member in Dutch organizations for patients with hearing loss to inform about hearing loss and promote prevention thereof.

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

The project's stakeholders are:

1. Researchers in the field of inner ear regeneration , because any advancements in the field will also promote their own research.
2. Patients suffering from hearing loss. Patients suffering from these conditions are very interested in other new opportunities for treatments since there are currently no other treatment available that successfully cure them. This approach could allow us to be one step closer of a therapy for them.
3. Otorhinolaryngologists that are looking for a better therapeutic approach to treat their patients.
4. [REDACTED] it is for the laboratory animals important that the experiments are carried out in a responsible and optimal manner, that refinements are properly implemented and that humane endpoints are closely monitored.
5. Grant organizations [REDACTED]

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 ultimate goal is to promote sensory regeneration in patients with hearing deficits I) by targeting the endogenous stem cells found in the inner ear. Pervious (and ongoing) in vitro and in vivo work from our group has set to determine:

Our primary research question is:

Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells (in vitro) thereby improving hearing (in vivo) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?

We aim to answer the following Sub-questions:

- 1) Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells (in vitro) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?
- 2) Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells thereby improving hearing (in vivo) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?
- 3) Are all de novo produced hair cells derived from LGR5+ supporting cells?

Animal experiments performed in old CCD license (AVD1150020186105):

- Survival of Lgr5+ progenitors in adult ototoxically-deafened mice (project finished)
- Proliferation and differentiation of Lgr5+ progenitors in vitro from normal hearing (young and adult) mice and from deafened mice (ongoing project)

Evaluate:

1. Proliferation of endogenous progenitors as cochlear organoids in old, young (normal hearing) and deafened Lgr5GFP mice

2. Differentiation capacity (MYO7A expression) in cochlear organoids using manipulation of different signaling pathways
3. Long-term expansion of organoids from young (normal hearing) Lgr5GFP or WT mice

GO CRITERIA

Differentiation capacity (MYO7A expression) in cochlear organoids from normal hearing Lgr5GFP mice

NO-GO CRITERIA

The absence of MYO7A+ cells observed after differentiation

*We have already seen (limited) MYO7A+ cells after differentiation in cochlear organoids from normal hearing Lgr5GFP mice using a combination of valproic acid (targets epigenetic control, inhibits HDAC), Wnt agonist (CHIR99021) and Notch inhibition (LY411575). The combination of VPA and CHIR99021; and the use of LY411575 alone are already been used in phase I clinical trials for patients with hearing loss. Hence, we will proceed to Experiment 1.

HIER Study: Human Inner Ear Regeneration:

- Human inner ear regeneration from resection material from surgery and from cadavers donated to science (ongoing project):
 - TC Bio protocol access human inner ear material derived from surgeries. Collaboration with ENT Department UMC Utrecht
 - Cadaveric study to access human inner ear material from recently-dead individuals. Collaboration with Pathology department UMC Utrecht.

Evaluate:

1. Presence of endogenous progenitors in human inner ear
Proliferation of endogenous progenitors in human inner ear epithelium as inner ear organoids
2. Differentiation capacity (MYO7A expression) in inner ear organoids
scRNAseq in freshly digested tissue to characterize progenitor cell populations
3. Correlate to age and hearing impairment

GO CRITERIA

Proliferation of endogenous progenitors (generation of inner ear organoids) in human inner ear epithelium in mature adult (aged) patients

NO-GO CRITERIA

The absence of proliferation/no organoids produced in mature adult patients

* We have already seen (limited) MYO7A+ cells after differentiation in cochlear organoids from human inner ear. We will now evaluate if endogenous progenitors are available in aged or hearing impaired individuals. If they are, we will evaluate proliferation and differentiation of Lgr5+ cells to MYO7A+ cells in cochlear organoids from aged mice.

With the results from the previous (and ongoing) in vitro work, we propose the following experiments in Appendix 1. We will answer sub-question 1 in Experiment 1. Regenerative capacity in vitro.

Experiment 1 (ex vivo):

1. A pilot study to optimize the culture conditions for cochlear organoids growth in vitro from young normal hearing WT mice (also surplus mice). The aim of this experiment is to generate a clonal, long-term expansion cochlear organoid model to reduce the number of animals needed in Experiment 2.
 2. An experiment to evaluate proliferation and differentiation of Lgr5+ cells to MYO7A+ cells in cochlear organoids from ototoxically-deafened, noise-induced deafened or in aged mice. Here we aim to evaluate if endogenous progenitor (Lgr5+) cells from the cochlea of deafened or aged mice have the potential to regenerate in vitro. We will start the experiments with ototoxically deafened mice and repeat with a small group of mice in the noise-induced model to validate the results in another very important model of acquired hearing loss, the noise exposure. We will also investigate if endogenous progenitor cells from the cochlea of aged mice express Lgr5 and/or proliferate and

regenerate in vitro. This will be correlated to the data we find in the human inner ear from aged individuals.

GO CRITERIA

Differentiation capacity (MYO7A expression) in cochlear organoids from normal hearing or deafened Lgr5GFP mice.

* Pilot experiments have shown differentiation of MYO7A+ cells with certain combination of drugs. We can then proceed to **Experiment 2**.

NO GO CRITERIA

The absence of MYO7A+ cells observed after differentiation

*If we find that no drugs allow Lgr5+ progenitors to differentiate to MYO7A+ cells, we will select different combination strategies until we find a combination that works. We will test a maximum of 16 drug combinations in vitro, If no combination of selected drugs reaches the GO criteria we will end the experiments.

Experiment 2 (in vivo):

We will evaluate regenerative capacity of Lgr5+ endogenous progenitors in the cochlea of ototoxically deafened mice after treatment with the combination of drugs selected in Experiment 1 We will test a maximum of 8 different treatments. Furthermore, in addition to combination of drugs that modulate the Wnt, Notch, Shh, FGF or BMP/TGF β signaling pathways, we will treat animals with neurotrophins to promote nerve-reinnervation. We will repeat the experimental approach of the best (combination of) treatment in noise-induced hearing loss to recapitulate the findings in this very important model of acquired hearing loss.

GO CRITERIA

If we see improved hearing performance (> 10% in ABR) or new MYO7A+ cells we will proceed to **Experiment 3** with the treatment that yields the best hearing performance or the larger number of MYO7A+ cells. We will evaluate proceeding to clinical trials if we see improved hearing performance (> 10% in ABR) in the animals.

NO GO CRITERIA

If we do not see hearing improvement or new MYO7A+ cells we will test other drugs that passed the GO CRITERIA. If we do this for 8 (combination of) treatments and we do not reach the GO criteria we will stop the experiments.

Experiment 3 (lineage tracing):

We will investigate the source for newly produced hair cells by performing lineage tracing. For this, Lgr5GFP mice will be crossed with Rosa26-tdTomato transgenic mice and we will induce the Rosa-tomato expression in newly produced hair cells by tamoxifen injection.

Previous (and ongoing) *in vitro* work (Part I)

AVD1150020186105

- Survival of Lgr5+ progenitors in adult ototoxically-deafened mice (finished)
- Proliferation and differentiation of Lgr5+ progenitors in vitro from normal hearing (young and adult) mice and from deafened mice (ongoing project)

Evaluate:

1. Proliferation of endogenous progenitors as cochlear organoids in old, young (normal hearing) and deafened Lgr5GFP mice
2. Differentiation capacity (MYO7A expression) in cochlear organoids using manipulation of different signaling pathways
3. Long-term expansion of organoids from young (normal hearing) Lgr5GFP or WT mice

GO CRITERIA

Differentiation capacity (MYO7A expression) in cochlear organoids from normal hearing Lgr5GFP mice

NO-GO CRITERIA

The absence of MYO7A+ cells observed after differentiation

HIER STUDY: Human Inner Ear Regeneration

- Human inner ear regeneration from resection material from surgery and from cadavers donated to science (ongoing project)

Evaluate:

1. Proliferation of endogenous progenitors in human inner ear epithelium as inner ear organoids
2. Differentiation capacity (MYO7A expression) in inner ear organoids
scRNAseq in freshly digested tissue to characterize progenitor cell populations
3. Correlate to age and hearing impairment

GO CRITERIA

Proliferation of endogenous progenitors (generation of inner ear organoids) in human inner ear epithelium in mature adult patients

NO-GO CRITERIA

The absence of proliferation/no organoids produced in mature adult patients

Evaluate other (combination of) drugs

Planned *in vivo* work (Appendix 1)

Experiment 1

Regenerative capacity in vitro

Evaluate

1. PILOT: Optimize culture conditions for cochlear organoids growth in vitro (young normal hearing WT (Surplus) mice)
2. Proliferation and differentiation of Lgr5+ cells to MYO7A+ cells in cochlear organoids from ototoxically-deafened, noise-induced deafened or in aged mice.

GO CRITERIA

Differentiation capacity (MYO7A expression) in cochlear organoids from normal hearing or deafened Lgr5GFP mice

NO-GO CRITERIA

The absence of MYO7A+ cells observed after differentiation

Evaluate other (combination of) drugs

Experiment 2

Regenerative capacity in vivo

Evaluate:

If LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells and improve hearing by manipulation of (combination of) different signaling pathways after ototoxically or noise-induced trauma?

GO CRITERIA

Improved hearing performance (>10% in ABR) OR new MYO7A+ cells after deafening

NO-GO CRITERIA

The absence of hearing improvement OR no new MYO7A+ cells

Evaluate other (combination of) drugs

Experiment 3

Lineage tracing

Evaluate:

Are all de novo produced hair cells derived from LGR5+ supporting cells?

Future clinical trials

Figure 5: Research strategy.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Our strategy is based on achieving the best experimental outcome by using a minimally needed number of animals. For that, we will start animal experiments only after achieving specific milestones as described above. In the last CCD license (AVD1150020186105), we evaluated if Lgr5+ supporting cells survive severe hair cell loss; we can then start animal experiment 1 knowing that there are Lgr5+ supporting cells available for growing cochlear organoids.

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	Manipulation of specific signaling pathways after deafening to promote hair cell regeneration
2	
3	Click or tap here to enter text.
4	
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.



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).
- 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
	1	Manipulation of specific signaling pathways after deafening to promote hair cell regeneration

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.

Our primary research question is:

Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells (in vitro) thereby improving hearing (in vivo) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?

We aim to answer the following Sub-questions:

1) Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells (in vitro) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?

2) Can LGR5+ supporting cells transdifferentiate to hair cells thereby improving hearing (in vivo) by manipulation of (combination of) different signaling pathways after deafening or age-related hearing loss?

3) Are all de novo produced hair cells derived from LGR5+ supporting cells?

We will answer sub-question 1 in Experiment 1. Regenerative capacity in vitro

Experiment 1.1: PILOT: Optimize culture conditions for cochlear organoids growth in vitro in young normal hearing WT (Surplus) mice

We will use young (p30-p60) WT male and female mice considered as surplus from our breeding protocol or from other breeding protocols. We will kill the animals without doing procedures on them. We will evaluate the best combination of growth factors and drugs targeting different signaling pathways to evaluate 1. Organoids proliferation as clonal-long term expanding cultures and 2. Differentiation to Myo7A+ cells. We will select the combination of drugs that yields the best organoid growth in expansion conditions and the best Myo7A expression in differentiation conditions to test in experiment 1.2

Primary outcome parameters

- Organoid generation, proliferation will allow us to determine if LGR5+ cells from normal-hearing mouse cochleas have the capacity to produce cochlear organoids which are able to clonally expand for long term.
- Myo7A expression by histological (immunofluorescence microscopy) and molecular (scRNA sequencing or flow cytometry) analysis will evaluate if new hair cells (expressing Myo7A) are produced after treatment.

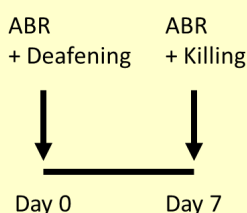
Experiment 1.2: Proliferation and differentiation of Lgr5+ cells to MYO7A+ cells in cochlear organoids from ototoxically-deafened, noise-induced deafened or in aged mice.

After selecting the best combination of treatments in Experiment 1.1 we will evaluate the capacity of Lgr5+ cells derived from deafened mice to produce cochlear organoids and to differentiate to hair cells in vitro. For that, we will evaluate the hearing capacity of mice with auditory brainstem responses (ABRs) before deafening by ototoxic drugs and 7 days later we will confirm hearing loss by ABRs, kill the animals and harvest the cochleae for organoids generation. We will repeat this experiment for noise-induced hearing loss in a small group of mice to validate the findings. If we find that old (>60 years old) patients have regenerative capacity in the HIER study (see strategy) we will repeat this experiment in a group of aged-mice (>p550). For this we will collaborate with other researchers in Utrecht and Groningen to use all parts of these aged mice and reduce the number of animals requested here.

Primary outcome parameters

- Organoid generation, proliferation, and differentiation will allow us to determine if LGR5+ cells deafened mouse cochleas have the capacity to produce cochlear organoids and to differentiate to hair cells.
- Myo7A expression by histological (immunofluorescence microscopy) and molecular (scRNA sequencing or flow cytometry) analysis will evaluate if new hair cells (expressing Myo7A) are produced after treatment.

Timeline



We will answer sub-question 2 in Experiment 2

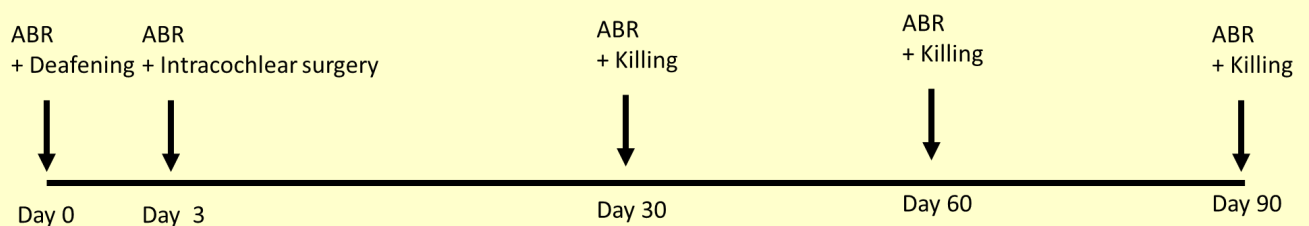
Experiment 2: Regenerative capacity (in vivo)

Hair cell regeneration after stimulation and/or inhibition of specific signaling pathways (Wnt, Notch, Shh, FGF, BMP/TGF β) in deafened mice. We will evaluate the hearing capacity of mice with ABRs before deafening by ototoxic drugs, 1-7 days later we will confirm hearing loss by ABRs, and inject selected drugs unilaterally (in one cochlea only, to have a match-control within each animal) via a surgical microinjection to the cochlea. Animals will be monitored and given pain relief. Short term < 30 days, mid-term 30 – 60 days, and long term >60 days after deafening and immediately after the third ABR measurement (to evaluate hearing restoration) has been performed, animals will be sacrificed and cochleas will be harvested for histological and molecular analysis. We will repeat this experiment for noise-induced hearing loss in a small group of mice to validate the findings.

Primary outcome parameters

- Myo7A expression by histological (immunofluorescence microscopy) and molecular (bulk RNA sequencing, scRNA sequencing) analysis will evaluate if new hair cells (expressing Myo7A) are produced after treatment.
- ABR will be applied to evaluate hearing capacity at baseline level (day 0), 3-7 days after deafening (to confirm animals are deaf, deafening is defined as >50 dB threshold shift) and at 3 different timepoints (up to 90 days) after addition of selected drugs (short term < 30 days, mid-term 30 – 60 days, long term >60 days). The primary outcome measure is the ABR threshold (in dB) and with this outcome measure we will confirm animals have been deafened by the procedures (see below) and evaluate if hearing has improved after the treatment.

Timeline



We will answer sub-question 3 in Experiment 3.

Experiment 3: Lineage tracing (in vivo)

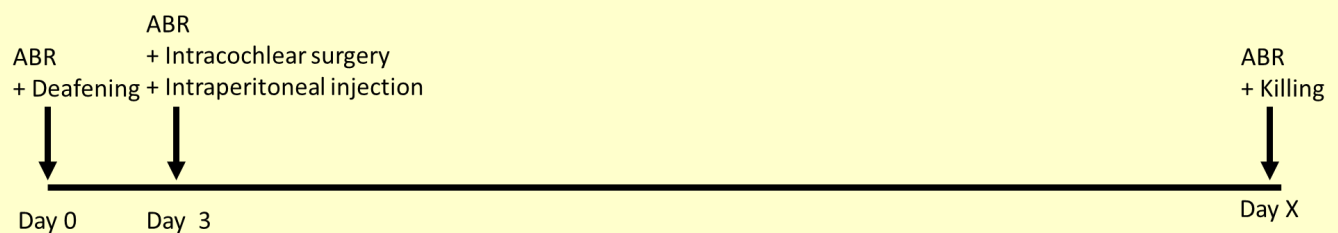
Lineage tracing of de novo produced hair cells. If hair cells are produced after ototoxic or noise-induced trauma, and/or if hearing restoration is achieved, we will evaluate with lineage tracing experiments if de novo produced hair cells are produced by LGR5+ progenitors. For that, we will evaluate the hearing capacity of mice with ABRs before deafening by ototoxic drugs 1-7 days later we will confirm deafness by ABRs, and inject the combination of drugs that achieves the best hair cell regeneration and hearing restoration in experiment 2 unilaterally (in one cochlea only, to have a match-control within each animal) via a surgical microinjection to the cochlea. We will also inject tamoxifen intraperitoneally on this timepoint to induce the recombination that allows to lineage trace newly produced cells from Lgr5+ progenitors. Animals will be monitored and given pain relief to prevent them from suffering from the surgical intervention. We will evaluate one time-point selected in Experiment 2 (the one that gave the best hearing performance or the greater number of new Myo7A+ cells) and animals will be killed after an ABR

measurement (to evaluate hearing restoration) has been performed. After that cochleas will be harvested for histological analysis. We will perform this in adult mice bred from the cross of the Lgr5GFP transgenic with the ROSA-tdTomato reporter mice

Primary outcome parameters:

Myo7A expression in RosaTomato + cells (endogenous) will be monitored by histological (immunofluorescence microscopy) analysis to evaluate if new hair cells (expressing Myo7A) are derived from Lgr5+ cells (RosaTomato + cells) produced after treatment.

Timeline



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

Procedures Experiment 1.1:

Killing: Animals will be killed by asphyxiation using a CO₂ chamber and cochleas will be immediately dissected.

Procedures Experiment 1.2:

Auditory Brainstem Responses (ABRs): We will record ABRs in mice before deafening, and 7 days after deafening to evaluate hearing performance. ABRs are performed under isoflurane anaesthesia. 3 electrodes are placed subcutaneously (behind the pinna, in the top of the head and in the front leg) and click-sound stimuli and pure-tone stimuli are presented in decreasing decibels until the threshold for hearing is reached. For normal-hearing mice ABRs measurements takes maximum 30 minutes. For deafened mice ABRs measurements takes maximum 15 minutes. Each animal undergoes this procedure three times in the duration of the experiment.

Deafening: Hearing loss will be induced by ototoxic treatment and a small-scale experiment will be done to validate the findings in a noise-exposure deafening model.

- **Ototoxic treatment:** Kanamycin will be administered subcutaneously under isoflurane anesthesia after ABRs are performed. Five minutes later, furosemide will be injected in the tail vein. We have experience with ototoxicity-induced hearing loss in mice (Smith-Cortinez et al., 2021, 2023). Animals will remain deaf during the course of the experiment and welfare will be monitored for the first 3 days after injections and weekly after that.
- **Noise exposure:** We will use previously published methods (Jongkamonwiwat et al., 2020), where the animals are kept under general anesthesia in a soundproof room and exposed to a loud noise for a certain period of time (30 min – 2 hrs hours). This protocol is performed on anesthetized animals. The animals will be monitored every 30 min to evaluate welfare and will be kept under a warm mat to prevent them to getting cold.

Jongkamonwiwat N, Ramirez MA, Edassery S, Wong ACY, Yu J, Abbott T, Pak K, Ryan AF, Savas JN. Noise Exposures Causing Hearing Loss Generate Proteotoxic Stress and Activate the Proteostasis Network. Cell Rep. 2020 Nov 24;33(8):108431. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108431. PMID: 33238128; PMCID: PMC7722268.

Killing: Immediately after the last ABR, animals will be killed by asphyxiation using a CO2 chamber and cochleas will be immediately dissected.

Procedures Experiment 2:

Auditory Brainstem Responses (ABRs): As described under Experiment 1.2. In this experiment each animal undergoes this procedure maximum 5 times in the duration of the experiment.

Deafening: As described under Experiment 1.2.

Intracochlear administration of selected drugs: Selected drugs from Experiment 1 targeting Wnt, Notch, Shh, FGF, BMP/TGF β will be administered by a surgical approach to reach the cochlea via the round window (see below the approach) 3 days after deafening under general anesthesia.

We will start with a combination of **valproic acid** (HDAC inhibitor to expose the epigenetically-hidden promoter of Atoh, which controls hair cell differentiation) plus **CHIR99201** (Wnt agonist) which have been tested in vitro, in vivo and in clinical trials before (never in adult Lgr5+ deafened mice) to promote hair cell regeneration (this combination of drugs already passed our GO CRITERIA and will be the first to be tested in the animals). We will also evaluate if the addition of neurotrophins promotes nerve-reinnervation. Before surgery, the animals will be anesthetized with injected anaesthesia and the protocol will be evaluated with the designated veterinarian, and an incision will be made posterior to the pinna near the external meatus after local administration of lidocaine (1%). The otic bulla will be opened to approach the round window niche. The end of a piece of PE 10 tubing will be drawn to a fine tip in a flame and gently inserted into the round window niche. The drugs will be dissolved in appropriate buffers and diluted 10-fold in polyethylene glycol 400 to their final concentration. This solution (total volume 1 μ l) will be injected into the round window niche of the left ear. Polyethylene glycol 400 with 10% DMSO was injected into the right ear as a control. The solution will be administered for 2 min. After the procedure animals will be monitored and given analgesia daily for 7 days or until the wound has healed.

Killing: Short term < 30 days, mid-term 30 – 60 days, and long term >60 days after deafened and deafened+treated animals will be killed by asphyxiation using a CO2 chamber and cochleas will be immediately dissected.

Procedures Experiment 3:

Auditory Brainstem Responses (ABRs): As described under Experiment 1.2. Each animal undergoes this procedure three times in the duration of the experiment.

Deafening: Hearing loss will be induced by ototoxic treatment

- **Ototoxic treatment:** Kanamycin will be administered subcutaneously under isoflurane anesthesia after ABRs are performed. Five minutes later, furosemide will be injected in the tail vein. We have experience with ototoxicity-induced hearing loss in mice (Smith-Cortinez et al., 2021, 2023). Animals will remain deaf during the course of the experiment and welfare will be monitored for the first 3 days after injections and weekly after that.

Intracochlear surgery (administration of selected drugs): The combination of selected drugs in Experiment 2 will be injected unilaterally with a micro-injection directly in the cochlea by a surgical procedure under anesthesia (as described for **Experiment 2**), 3 days after deafening (immediately after the second ABR measurement). After the procedure animals will be monitored and given analgesia daily for 7 days. To evaluate proliferation and differentiation we will perform different read-outs (immunofluorescence microscopy, bulk RNA sequencing or scRNAseq of selected hair cell and progenitor cell markers).

Intraperitoneal injection of Tamoxifen: After the intracochlear administration of drugs (while the animal is still anaesthetized) we will perform an intraperitoneal injection of an optimal dose of Tamoxifen to induce the cre recombinase for lineage tracing.

Killing: Mice will be killed on one timepoint selected in Experiment 2. Animals will be killed by asphyxiation using a CO2 chamber and cochleas will be immediately dissected.

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

Sample size calculations

We will do exact statistical calculations with a statistician when the protocol has been approved. We understand this could mean that the total number of animals is higher or lower than the number requested.

We have used the following (theoretic) calculations to predict the sample size needed. We have come up with a sample size of 15 for all in vivo experiments.

To minimize the number of animals used we have made efforts to use all male and female mice born in our facility (to prevent sacrificing the unused sex); and we have reduced the number of normal-hearing and vehicle control animals. This is further explained in reduction.

Experiment 1.1: PILOT: Optimize culture conditions for cochlear organoids growth in vitro in young normal hearing WT (Surplus) mice

We aim to evaluate in a pilot experiment if cochlear organoids can be expanded long-term in culture over many passages (over 3, called time points here-on). We currently use one cochlea per condition because we have not been able to consistently expand the cultures long-term. However new publications describe the long-term expansion of neonatal mouse cochleas and therefore we want to evaluate this in adult mouse cochleas.

For this experiment we will use a maximum of 216 WT mice:

We will evaluate 1 control condition (expansion medium) over 3 time points plus 8 conditions over 3 time points different differentiation mediums). We will use 8 mice per condition to have enough cochlear organoids per condition to do readouts such as immunofluorescence microscopy and qPCR or bulk RNA sequencing) = **216 normal hearing mice**. We expect no drop-outs since these are normal hearing animals.

Experiment 1.2: Proliferation and differentiation of Lgr5+ cells to MYO7A+ cells in cochlear organoids from ototoxicity-deafened, noise-induced deafened or in aged mice.

For this experiment we will use a maximum of 528 Lgr5GFP mice:

To evaluate proliferation and differentiation we will perform different read-outs (immunofluorescence microscopy, bulk RNA sequencing or scRNAseq of selected hair cell and progenitor cell markers). We will evaluate one control condition (expansion medium) and one experimental condition (differentiation medium, selected above) x 3 readouts x 3 different life stages (young, adult, mature adult) x 8 mice per condition (2 cochleas per mouse) = **144 normal hearing Lgr5GFP mice**

Because of that, we request 2x the number of normal hearing mice for ototoxically and noise-induced deafened animals. We expect to validate these numbers (and repeat power calculations) once we have more experience with the model. The number of animals requested is $144 * 2 = 288$ **ototoxically-deafened Lgr5GFP mice**

For noise-induced deafened we will repeat the experiment to validate in another model using only 1 life-stage = $288 / 3 = 96$ **noise-induced deafened Lgr5GFP mice**.

Based on the power calculations above, we expect a total of 15 animals per group; however, because 1 cochlea can become 1 experimental condition and one animal has 2 cochleas, we can use $15 / 2 = 8$ mice per group. Exact power calculations will be performed per planned experiment and discussed with the statistician.

Experiment 2: Regenerative capacity (in vivo)

For this experiment we will use a maximum of 450 Lgr5GFP mice:

There will be a maximum of 20 (WT or Lgr5GFP) mice used for training/development of the surgery and 20 (WT or Lgr5GFP) mice the pilot for the intracochlear administration surgery;

According to the theoretic calculations, we will use 15 mice in treated groups and groups of 5 mice for controls (re-use historical data and reduce the number of animals).

Normal hearing group: 5 mice.

Treated groups + ototoxicity: For the intracochlear administration treatments we will use groups of 15 mice. It is still not known which (combination of) signaling pathway agonists and antagonists (and in what concentration) will be used; for this reason we request a max. of 8 groups. We will evaluate 3 different timepoints per group. $15 \times 8 \times 3 = 360$

Treated group + noise-trauma: The specific (combination of) growth factors that the above 8 experimental groups lead to the best hearing improvement will be repeated in a group of 15 mice for noise-induced hearing loss for three different timepoints after the intracochlear administration of selected drugs = $15 \times 3 = 45$ mice.

The total number of animals = 40 (training/development) + 5 mice (control) + 360 (treated + ototoxicity) + 45 (treated + noise-trauma) = 450 mice.

Experiment 3: Lineage tracing (in vivo)

For this experiment we will use a maximum of 40 Lgr5GFP mice:

The specific (combination of) growth factors that leads to the best hearing improvement in Experiment 2, will be used in Experiment 3 to evaluate if Lgr5+ cells give rise to the newly produced hair cells in 1 timepoint. We will use groups of 15 mice (as described above) for the deafened + treated groups and groups of 5 mice for the control groups (and re-use historical data).

Normal hearing group = 5 mice

Tamoxifen-only group = 5 mice

Lineage tracing group ototoxicity = 15 mice

Lineage tracing group noise-trauma = 15 mice

The total number of animals is = 40

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
Click or tap here to enter text.	Mouse	Own breeding	p30-p550	1234	Males and females	WT and/or Lgr5GFP transgenic	C57Bl/6J

Provide justifications for these choices

Species	We will use mice for these experiments because the deafening models we have experience with (ototoxicity and noise-induced hearing loss) are almost the same to the acquired hearing loss that patients undergo with use of diuretics and antibiotics in the clinic (ototoxicity) and to noise exposure. We have experience with working with the
---------	---

	C57BL/6J mice strain and in the context of our hearing loss model, this strain has been a choice of model for other research groups before.
Origin	We will breed the line in our animal facility because we need to use HET transgenic mice and the discomfort of the travel for the animals is high. They are bred in the USA and for that reason we decided (in conversation with the IvD Utrecht) to breed them in Utrecht.
Life stages	We want to evaluate age-related changes in the regenerative capacity of the cochlea in different adult stages. We are interested in young adult, mature adult and middle age for translational purposes since the majority of patients with hearing loss are adult and we aim to evaluate an age where the hair cell regeneration therapy gives the best results to the patients.
Number	<p>The number of animals requested in this animal experiment is 1234. The specific calculations per experiment has been detailed in statistical methods.</p> <p>Experiment 1.1: PILOT: Optimize culture conditions for cochlear organoids growth in vitro in young normal hearing WT (Surplus) mice: For this experiment we will use a maximum of 216 WT mice.</p> <p>Experiment 1.2: Proliferation and differentiation of Lgr5+ cells to MYO7A+ cells in cochlear organoids from ototoxically-deafened, noise-induced deafened or in aged mice: For this experiment we will use a maximum of 528 Lgr5GFP mice.</p> <p>Experiment 2: Regenerative capacity (in vivo): For this experiment we will use a maximum of 450 Lgr5GFP mice.</p> <p>Experiment 3: Lineage tracing (in vivo): For this experiment we will use a maximum of 40 Lgr5GFP mice.</p>
Gender	We will use male and female mice. Female mice (and humans) are less susceptible to hearing loss (by ototoxicity and noise-induction) than male mice. We have evaluated in a previous (unpublished) study which dose of kanamycin allows to induce hair cell loss and hearing loss to the same extent in female as in male mice. We have observed that 900 mg/kg kanamycin + furosemide in females gives the same hearing loss and hair cell loss as 700 mg/kg kanamycin + furosemide in males. Hence we use both genders but with different doses of kanamycin.
Genetic alterations	We use the Lgr5GFP heterozygous (HET) transgenic mice model because it allows us to track LGR5+ cells in the mouse via the addition of GFP in the promotor of the Lgr5 gene. There are currently no good antibodies to track LGR5 and hence this allows us to follow LGR5+ cells. We have experience using this animal model for the past 5 years.
Strain	We choose the C57BL/6J mice strain because the Lgr5GFP mice model is based on the C57/BL6J mice strain. These animal model allows to follow Lgr5GFP positive cells in the in vivo and in vitro experiments. The C57BL/6J mice strain is a good model for hearing loss since it resembles ototoxicity very well. We have optimized the ototoxicity protocol (furosemide + kanamycin) to match the effects seen in patients when they receive the combination of these two drugs, validating the choice of the strain for these type of experiments. Noise-induced hearing loss has also been validated in this strain and it also resembles the damage patients experience after high noise exposure.

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.

We will give pain relief medication so that animals do not feel pain during the healing of the surgical wound after intracochlear administration of compounds

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

Weight loss

Infection after surgery

Deafness

Explain why these effects may emerge.

Deafening: Ototoxic deafening can cause a **reduction in weight** due to the fact that furosemide is a diuretic. Animals will be monitored daily after deafening for 3 days and once a week after that for the continuation of the experiment. A small number of animals (less than 1%) might die due to the ototoxic medication (kanamycin and/or furosemide). In the past 3 years I have had to kill 1 animal due to sickness after ototoxic treatment. I have used more than 300 animals (0,3%).

Intracochlear administration of selected drugs: The intracochlear microinjection is a surgical procedure performed under general anesthesia and therefore **infections** can occur on the wound site. This procedure will be conducted by an expert, to minimize the impact on welfare of the animals and under sterile conditions to prevent infection. Animals will undergo pain while the surgical wound heals. Animals will be administered pain relief medication to prevent them from suffering.

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

Deafening: we use a concentration of kanamycin and furosemide that allows to deafen the animals but is not severely toxic. We have refined our protocols to use the lowest doses of drug to minimize unnecessary discomforts of the animals.

Intracochlear administration of selected drugs: We will use 40 mice to develop and learn the surgical technique To optimize the injections and minimize the risk of injection. We will work in a sterile environment to reduce chances of infection. We have all been trained to work in sterile conditions as parts of our work.

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.

- If the animals lose more than 20% of their weight (monitored daily for the first 3 days after injections and weekly after that) humane end point will be reached and animals will be killed.
- Welfare of the animals will be monitored by visual inspection, if animals are not showing signs of being healthy humane end point will be reached (after consultation with specialist in the animal facility) and animals will be killed.
- If the animals get an infection after surgery, humane endpoint will be reached (after consultation with specialist in the animal facility) and animals will be killed.

Indicate the likely incidence.

1/300 mice

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).

Discomfort levels per procedure:

Auditory Brainstem Responses (ABRs): mild

Deafening:

- Ototoxic treatment: moderate
- Noise exposure: moderate

Intracochlear administration of selected drugs: moderate

Killing: mild

Cumulative discomfort per experimental group

Experiment 1.1

Normal hearing group: 100% mild 216 mice

Experiment 1.2

Normal hearing group: 100% mild: 144 mice

Deafened groups: 99.7% moderate: 383 mice
0.3% severe: 1.1 ~ 1 mouse

Experiment 2

Training group: 100% moderate: 40 mice

Normal hearing group: 100% mild: 5 mice

Treated groups + ototoxicity: 99.7% moderate: 359 mice

0.3% severe: 1.1 ~ 1 mouse Treated group + noise-trauma: 99.7% moderate:
45 mice

Experiment 3

Normal hearing group = 100% mild: 5

Tamoxifen-only group = 100% mild: 5

Lineage tracing groups (ototoxicity + noise-trauma) = 99.7% moderate: 30

0.3% severe: 0.09 ~ 0 mouse

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>Non-animal alternatives available in our field are inner ear organoids. These are either derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) or from primary cochlear tissue and can represent a good model for inner ear development. We are taking steps to evaluate if cochlear organoids from primary cochlear tissue (from mice and patients) can be used to model hair cell regeneration in vitro. We have initiated these steps in the previous animal license (AVD1150020186105) and aim to continue in this one (with experiment 1.1) Although we can evaluate if new hair cells are produced, the functional hearing improvement cannot be tested in vitro because for functional assessment we need the whole hearing system composed of the organ of Corti, auditory nerve and auditory brainstem. Innervation is a key point to achieve functional recovery. Here we aim to promote re-innervation with the use of neurotrophins in vivo; however several groups are working towards a co-culture of cochlear organoids and spiral ganglion neurons. We are also taking steps in this regard with the aim to contact our collaborations in Cambridge and work on an Organ-on-Chip model that allows functional assessment of the mechano-electrical transduction channels that allow hair cell function and spiral ganglion neuron activation.</p> <p>We cannot yet replace the animal experiment but we are taking great steps to work on animal-free models in our field.</p>
Reduction	<p>We have made efforts to use all HET mice born from our breeding. In the past CCD license (AVD1150020186105) we used males only, and that meant that all HET female mice were killed without use, increasing the total number of animals used. We evaluated the concentration of kanamycin required to deafen females to the same extent as males since it is known that females have less susceptibility to hearing loss than males (in mice and humans). We now use male and female mice.</p> <p>To reduce number of animals used we will try to use less normal-hearing animals since we have already evaluated their hearing in the past. We record ABRs before deafening, which will provide a within-animal reference of normal hearing. For comparison of histology and molecular analyses we can compare to the data in normal-hearing mice in previous publications.</p> <p>We will aim to use aged mice in collaboration with other centers (UMCG and Brain Center UMC Utrecht) so that we do not have to age animals ourselves considering the amount of discomfort these type of experiments bring to the animals.</p> <p>With the generation of the cochlear organoid model we are currently developing in our lab, we can reduce the number of animals needed by evaluating in vitro if a specific drug promotes hair cell regeneration before testing it in the animals. That way, we will not use all compounds in the animals but only those which have promise in vitro. We will also use data from human organoids to evaluate which compounds to test in the animals. For now, the cadaveric study is not suitable for organoids growth because the cells in the cochlea die rapidly and it has been described that organoid growth from the cochlea of cadavers is not efficient. Also, the use of schwannoma patient-derived material does not represent the healthy situation because these patients have tumors that likely produce toxins that harm the hair cells. These patients have limited hearing performance, hence, studying it in mice is more relevant for the healthy and hearing loss translation to patients than the cadavers or schwannoma patients.</p>
Refinement	<p>We have several years of experience with working with animal experiments for hearing loss, including guinea pigs treated with cisplatin and the combination of kanamycin and</p>

furosemide, and C57BL/6J (WT) and Lgr5GFP transgenic mice treated with the combination of kanamycin and furosemide. We have optimized the concentrations of kanamycin and furosemide to use as low as possible to reduce the side-effects. We give mice soft food and or high protein food after deafening to ensure they recover after the procedure. We inject them under anesthesia so they do not feel the intravenous injections. Surgery and ABRs are performed in a warm mat. We let them recover in a warm mat until they show clear signs of recovery.

The unilateral induction of hearing loss has been mentioned by the DEC. We have refined the protocol to do systemic administration because unilateral injection would increase the number of animals to twice as much because we use 2 cochleas per mice to reach to our conclusions. Further, the hearing loss produced by local administration of drugs has been shown to be highly variable, meaning we would have to increase the number of animals to compensate for those that do not respond to the treatment. Although we inject systemically, the animals are not deaf (severe to profound hearing loss), they have residual hearing that allows them to have some sense of hearing.

To prevent and lower discomfort the noise exposure will be performed on anesthetized animals. The animals will be monitored every 30 min to evaluate welfare and will be kept under a warm mat to prevent them to getting cold.

Besides, our team has great technical expertise that will help us minimize welfare costs when performing complex animal procedures like intracochlear microsurgery. However, new animal workers need to be trained on these techniques so we will do pilot experiments in 40 mice to refine the surgical approach and will get familiar with the techniques before starting. We will request training from other researchers that have experience with this approach.

To ensure the animals are doing fine we will monitor them daily or weekly depending on the procedures they undergo and we have a great animal facility team that ensures their wellbeing. We will give them pain management and great post-operative care to ensure they are well taken care of after complex procedures.

To prevent the animals to be scared by losing the sense of hearing, we will give them a normal hearing buddy per cage to ensure they rely on their normal hearing mates.

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.

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 isolate cells from cochlear tissue to grow organoids and to evaluate cochleas by histology. For that we need to kill the mice.

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.

CO2 asphyxiation

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202417856
2. Titel van het project : Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients
3. Titel van de NTS : Stamcellen van oor ter bevordering van herstel van het gehoor van slechthorende patienten

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: 02-02-2024
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 07-02-2024
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 08-02-2024 / 05-03-2024
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 26-03-2024

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 07-02-2024
- Plaats: Online via Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: Onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de achtergrond, de doelgroep en de (power)berekening. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die 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: 08-02-2024
- Datum antwoord: 05-03-2024
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U heeft in de vergadering reeds toegelicht welke behandelstrategieën u voor ogen hebt en waar die op aangrijpen. Kunt u deze informatie in de aanvraag bij 3.1 ook uitgebreider toelichten? Er wordt ergens in de aanvraag al wel kort naar gerefereerd, maar de DEC vindt het duidelijker als dit bij Achtergrond vermeld staat.

We have applied the changes suggested by the DEC. We have added the specific signaling pathways we will target and their combinations in the aim at the end of the background section.

- 3.2 Doel: U heeft de doelen o.a. vermeld bij 3.4.1 maar niet bij 3.2.1, daarnaast lijken de beschreven doelen steeds net anders geformuleerd te worden. De DEC ziet de doelen graag bij 3.2.1. Goals. Kunt u dit toevoegen en een consistente formulering aanhouden?

We are sorry for the inconsistencies, we have now added the same goals in both places.

- 3.3 Belang

De dieren hebben er belang bij om niet als proefdier voor het onderzoek ingezet te worden. Kunt u bij punt 4 het belang van de dieren aanvullen? Kunt u bij 5. Grant organizations de stakeholder specifiek benoemen aangezien zij het project (mede) financieren?

Binnen de gemeenschap van mensen met een gehoorbeperking is een subcultuur waarbij een implantaat/horen niet altijd gewenst is. U heeft al uitgebreid toegelicht dat sommige mensen met amper restgehoor inderdaad gelukkig zijn in de dove wereld. U gaf aan dat de mogelijke behandeling niet gericht is op deze groep mensen maar op de grote groep patiënten (de bulk) die nog restgehoor heeft en wel (beter) wil horen. Kunt u uw reflectie kort vermelden in het projectvoorstel (in de inleiding)?

We have now improved the text to add animals and grants stakeholders and have included the statement regarding how the deaf (severe to profound hearing loss) community is not always interested in new therapeutic interventions and how most patients with different degrees of hearing loss are greatly interested in new therapies and will largely benefit from studies like this one.

- 3.4 Strategie

De DEC vraagt zich af wat de rationale is voor 8 behandelingen. Kunt u aangeven waarom u op maximaal 8 verschillende behandelingen gaat testen? Van tevoren test u *in vitro* verschillende behandelingen, maximaal 16 behandelingen en daarvan gaat maximaal de helft door (dit is vrij veel). Zou het niet realistischer zijn om bijvoorbeeld maximaal 4 behandelingen in de dieren te testen? Gaat u ook verschillende doseringen testen, zijn de testmiddelen veilig, hoe worden ze toegediend en is er ook een effect op gezond weefsel? Kunt u dit kort toelichten?

De DEC vraagt zich bij experiment 2 af waarom na het aanbrengen van de gehoorbeschadiging direct overgegaan wordt naar de behandeling? Kunt u dit verduidelijken?

U geeft bij experiment 2 als no-go: geen gehoorverbetering én geen nieuwe Myos7A+ cellen. Klopt deze combinatie? Kunt u dit verduidelijken?

We have used 8 treatments because this is a relatively new field. Some combination of therapies have been used in neonatal mice before, however it has only been tested in adult mice once or twice. We aim to target signaling pathways, open the epigenetic barrier and improve re-innervation at the same time to promote hearing restoration. We have adjusted the number of combinations we will test in vitro and we have selected max 8 in vitro. We have selected max 8 in vivo to test some with different dosages and also different drugs that target the same signaling pathway as well. In our previous license we also requested 8 max combination therapies; unfortunately due to time constraints we were not able to do these experiments, because we were aiming to establish the deafening protocols and evaluate the survival of supporting cells even long-term, and how we have a good protocol and model to evaluate the treatments. We do not aim to test all treatments at once, we will test one treatment first and then see how we can improve the combinations for the next experiment. We also want to be able to use new treatments if new drugs are available for the different targets we have selected.

Regarding experiment 2, we will treat within 1 week after ototoxic trauma. This is because hearing loss occurs very fast after kanamycin and furosemide injection (even within a few hours). We will evaluate if they are deaf 24-72 hrs after induction of hearing loss and if they are we will proceed to the intracochlear administration of drugs. We have observed that 1 month after damage there is the same hearing- and hair cell loss in the animals so to prevent them from unnecessary long term suffering we aim to do this experiment shortly after damage. We have also seen a peak in Lgr5 expression 7 days after damage so that is why we also aim to target these cells within the first week.

Regarding the no-go, we have fixed it to: no hearing improvement or no new Myos7A+ cells, because if we do see Myo7A+ cells or only hearing improvement this is enough for us to proceed to next experiments.

Bijlage 1

- B. De dieren

U geeft een lage α en hoge power op. De DEC begrijpt dat een statisticus later een exacte berekening maakt en het daarom nu niet mogelijk is om in detail te benoemen. De IvD monitort hierop. Theoretisch kunnen deze parameters echter gebruikt worden als de aanvraag vergund is waardoor mogelijk meer dieren ingezet worden dan noodzakelijk voor het doel van de proef. Kunt u een algemene zin opnemen en (zoals al het geval is) aangeven dat dit verder afgestemd wordt met de statisticus?

U geeft aan dat 3x8 muizen nodig zijn voor de controlegroepen. Kunt u dit verder onderbouwen?

We have made the necessary changes in the statistics part to address your suggestions. We have tried to clarify the question regarding the 3x8 mice however I am not exactly sure in which experiment the question is from.

- E. Humane eindpunten

U geeft aan dat mogelijk infectie kan optreden na de injecties. Hier wordt dit voor het eerst benoemd. Kunt u uitgebreider toelichten wat de oorzaak van de infectie dan is? Heeft u rekening gehouden met eventuele uitval in de berekeningen van de aantallen dieren? U vermeldt dat op basis van uw eerdere ervaring 1 op de 300 muizen een HEP kan bereiken. Wilt u hier een percentage aan toevoegen?

Yes, infections can occur after the intracochlear administration of drugs because it is a surgical approach. We have made the necessary changes in the text. We expect no infections but it is always a risk. Yes, the percentage is 0.003%, I have now added it to the text.

- F. Classificatie van ongerief

U geeft aan bij 'Discomfort levels per procedure' dat het ongerief van Killing 'non-'recovery' is. Dit zou echter 'licht' ongerief moeten zijn volgens de DEC. Wilt u dit aanpassen? Kunt u bij de experimenten bij 'Cumulative discomfort per experimental group' de genoemde percentages controleren, het totale percentage ongerief per classificatie geven en eventueel ook de absolute aantallen vermelden?

We have made the requested changes.

- G. Vervanging, vermindering en verfijning

De gehoorbeschadiging wordt systemisch aangebracht. Lokaal zou mogelijk minder ongerief (unilateraal doof) opleveren en een verfijning betekenen, zeker omdat muizen al niet goed kunnen zien. U heeft toegelicht dat bij een lokale toediening alle cellen in het oor (en dus ook de stamcellen) beschadigd worden, waardoor deze aanpak niet geschikt is voor de onderzoeksvraagstelling (omdat er dan geen stamcellen meer over blijven en het regeneratievermogen onvoldoende is. Bij systemische toediening van de combinatie van kanamycine en furosemide worden de haarcellen wel beschadigd en treedt er gehoorverlies op, maar de muizen zijn niet volledig doof, waardoor het ongerief ook als matig mag worden ingeschat. Kunt u in de bijlage opnemen waarom een lokale methode niet toepasbaar is? U heeft de mogelijkheden voor het gebruik van humaan weefsel onderzocht (o.a. postmortem materiaal) maar het weefsel is suboptimaal. Kunt u ook in de aanvraag duidelijker onderbouwen waarom het gebruik van humaan weefsel in plaats van weefsel van oude muizen niet mogelijk is voor dit onderzoek?

We have made the requested under refinement and reduction respectively.

Niet Technische Samenvatting

Kunt u de titel van de NTS aanpassen, aangezien het onderzoek niet om meerdere zintuigen gaat? Wilt u de NTS controleren op technische termen, zoals elektrische zenuwpotentialen, regeneratie, zintuigcellen, capaciteit van het gehoororgaan, bewerkstelligen, *in vitro*, *in vivo*, en euthanasie. En waar mogelijk dit jargon en moeilijk taalgebruik vervangen, omdat de NTS voor het algemene publiek begrijpelijk moet zijn?

Het is aangepast. Euthanasie is een bekende veel voorkomende term, aangezien er in de media veel aandacht voor is. Die term laten we staan.

- 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. Dit project, een *proof of principle*, betreft nieuw moleculair farmacologisch/celbiologisch onderzoek om differentiatie van stamcellen te bevorderen na gehoorschade. Het onderzoek sluit goed aan op voorgaand onderzoek waar bij (jonge) muizen de regeneratieve mogelijkheden bij binnenoorslechthorendheid en de rol van het Wnt/Lgr signaaltransductiesysteem onderzocht werd (AVD1150020186105). In eerder onderzoek was de kans om humane weefselmonsters te onderzoeken om een vergelijking te maken tussen organoïden uit menselijk weefsel en organoïden van muizen, die in deze aanvraag als proefdier worden gebruikt. De resultaten waren veelbelovend en bevestigden de directe translationele toepassing van de onderzoeksstrategie. Gezien de zeer beperkte beschikbaarheid van optimaal menselijk weefsel, zal als eerst stap een experiment met organoïden van muizen uitgevoerd worden (experiment 1). Tevens zal de klinische relevantie, herstel van de haarcellen en het gehoor, na gehoorverlies in muizen worden getest (experiment 2 en 3). Als de vorming van nieuwe haarcellen, en dus het herstel van het gehoor slaagt, zou dit een enorme vooruitgang betekenen en de levenskwaliteit van veel mensen met gehoorschade of -verlies duidelijk kunnen verbeteren.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën, te weten fundamenteel en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is meer inzicht te verkrijgen in de werking van LGR5+ ondersteunende cellen en hun rol bij de regeneratie van haarcellen na gehoorverlies in muizen. Het uiteindelijke doel van het project is het bevorderen van het regeneratieproces in het binnenoor, en daardoor het gehoor, na gehoorverlies bij mensen. Hierdoor zou de levenskwaliteit van veel mensen met gehoorschade of gehoorverlies aanzienlijk kunnen

verbeteren. De DEC vindt dit project translationeel relevant en 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 KNO-onderzoeksveld en de behoeften vanuit de humane gezondheidszorg en specifiek gericht op mensen met gehoorverlies of gehoorschade.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers, de zorgprofessionals, de humane patiëntengroep en tot slot de financierende instanties. De muizen hebben als proefdieren belang bij het gevrijwaard blijven van de experimenten, de toegediende gehoorschade en de vroegtijdige dood. De onderzoekers, de zorgprofessionals op dit gebied en de (toekomstige) mensen met gehoorverlies of -schade hebben groot belang bij meer kennis over deze veelvoorkomende aandoening en de mogelijke ontwikkeling van een therapie waardoor hun levenskwaliteit zou kunnen verbeteren. Voor de individuele onderzoeker en de instanties ten aanzien van de financiering kan het van belang zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
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 ten aanzien van o.a. intracochleaire microchirurgie van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De onderzoekers zijn zeer ervaren met de huidige procedures en het diermodel en bewust bezig met exploreren van diervrije methodes en verfijning van het diermodel. Dit draagt 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.

In eerdere onderzoeken naar gehoorbeschadiging werden cavia's i.p.v. muizen ingezet. Voor muizen zijn echter veel meer moleculaire tools beschikbaar dan voor cavia's wat voor dit moleculairbiologische onderzoek essentieel is. De gehoortest (ABR) bij de muizen is drastisch maar vindt onder anesthesie plaats. Men induceert gehoorschade bij oude muizen omdat stamcellen bij oude muizen mogelijk minder goed functioneren, vergelijkbaar met de humane situatie. Dat hiervoor 'oude' muizen gebruikt worden vindt de DEC zeker relevant. Tevens wordt gebruik gemaakt van transgene muislijnen waardoor meer mogelijkheden voor onderzoek geboden worden. Hiervoor is voor deze aanvraag een reeds eerder in GDL gefokte transgene muislijn opnieuw opgestart. De DEC vindt de dierkeuze dan ook geschikt en ethisch verantwoord.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Voor de experimenten worden

normaal horende en doofgemaakte (transgene) muizen inzet. De DEC had graag, op basis van eerdere resultaten, een betere onderbouwing gezien ten aanzien van de benodigde 15 dieren per groep. De berekening van het aantal dieren had eenvoudiger gekund maar is voldoende. Daarbij opgemerkt dat, in tegenstelling zoals vermeld bij A. sample size calculations, de statistiek vóór goedkeuring van WerkProtocollen door de Instantie voor Dierenwelzijn plaatsvindt en de gevraagde aantallen na een berekening door een statisticus uiteraard nooit overschreden kunnen worden zonder goed onderbouwde en vergunde wijzigingsaanvraag. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

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.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is met 'matig' realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt met name veroorzaakt door het onder verdoving aanbrengen van permanent gehoorverlies door blootstelling aan zeer hard geluid of door operatief ototoxische middelen te injecteren. De onderzoekers hebben de concentraties kanamycine en furosemide (die hier als ototoxische middelen gebruikt worden) geoptimaliseerd waardoor de dosering, en daardoor de bijwerkingen, zo min mogelijk zijn. Met behulp van Auditory Brainstem Responses (ABR's) wordt onder verdoving drie maal de gehoorfunctie gemeten. De dieren krijgen na de operatie medicatie toegediend om pijn te voorkomen.
12. De integriteit van de dieren wordt met name fysiek aangetast door de ABR-testen en het onder verdoving aanbrengen van permanent gehoorverlies waarna postoperatieve pijnstilling toegediend wordt en hun welzijn wordt gemonitord.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het aantal dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat (1 op 300 dieren bij een totaal van 1234 muizen). Een HEP wordt bereikt na 20% gewichtsverlies of een sterk verminderde gezondheid van de dieren. Tevens kan op basis van eerdere ervaringen van de onderzoeker niet worden uitgesloten dat door een infectie na de operatieve injectie, twee dieren een humaan eindpunt bereiken en geëuthanaseerd moeten worden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er op dit moment nog geen geschikte vervangingsalternatieven, zoals humaan weefsel, zijn voor het testen van de functionele gehoorverbeteringen op het noodzakelijke gehele gehoorsysteem. De ontwikkelingen zoals organ-on-chip worden echter nauwlettend gevolgd.
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 wordt o.a. voor analysevergelijkingen gebruik gemaakt van eerdere publicaties en tevens wordt stapsgewijs gewerkt om onnodige inzet van dieren te voorkomen.
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. Zo worden 'dove' muizen bij een horende muis in hun kooi geplaatst ter geruststelling. Daarnaast worden de transgene muizen bij het GDL van de vergunninghouder gefokt en niet in de Verenigde Staten om transportstress van de dieren zoveel mogelijk te verminderen.

De DEC heeft gediscussieerd over de door systemische toediening van ototoxische middelen aangebrachte gehoorbeschadiging, terwijl een lokale methode mogelijk minder ongerief zou opleveren omdat er dan sprake is van unilaterale doofheid. De onderzoeker heeft voldoende toegelicht dat bij een lokale toediening alle (stam)cellen in het oor beschadigd worden en het regeneratievermogen dan onvoldoende wordt. Bij systemische toediening van de combinatie van kanamycine en furosemide worden de haarcellen wel beschadigd en treedt er gehoorverlies op, maar de muizen zijn niet volledig doof, waardoor het ongerief matig blijft.

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 worden ingezet waarbij rekening wordt gehouden met het genderverschil bij de toediening van de doses medicatie (ototoxiteit) aangezien mannen, zowel bij muizen als humaan, vatbaarder zijn voor gehoorverlies dan vrouwen.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood t.b.v. van histologisch onderzoek en zodat de benodigde cellen uit het cochleair weefsel geïsoleerd kunnen worden voor het kweken van organoïden. 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 meer inzicht in de werking van LGR5+ ondersteunende cellen in relatie tot het regeneratieproces van haarcellen na gehoorverlies bij muizen, 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 in totaal 1234 proefdieren plaats, waarvan een derde licht ongerief en twee derde van de muizen matig ongerief zal ervaren. Op basis van eerdere ervaringen van de onderzoeker kan niet worden uitgesloten dat door een infectie na de operatieve injectie (ernstig ongerief) twee dieren een humaan eindpunt bereiken en geëuthanaseerd moeten worden. De kans hierop is echter zo klein (0.003%) dat de DEC een Beoordeling Achteraf niet noodzakelijk acht.
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat een therapie ontwikkeld kan worden om gehoorverlies bij mensen te verminderen waardoor de kwaliteit van leven aanzienlijk kan verbeteren. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstellingen behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat onderzoek om de regeneratiecapaciteit in het binnenoor, en daarmee herstel van het gehoor, na gehoorverlies bij mensen te bevorderen 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. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

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
AVD11500202417856

Bijlagen

2

Datum 2 februari 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 februari 2024. Het gaat om uw project "Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202417856. 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

2 februari 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202417856



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: Post-doc
Afdeling: KNO-heelkunde
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: assistant professor
Afdeling: KNO-heelkunde
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: KNO-arts
Afdeling: KNO-heelkunde
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 2024
Geplande einddatum: 1 januari 2029
Titel project: Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients
Titel niet-technische samenvatting: Stamcellen van oor ter bevordering van herstel van de zintuigen in patiënten met gehoorverlies
Naam DEC: DEC-Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl


Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.617,-
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: 1 februari 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD11500202417856
Bijlagen
2

Datum 2 februari 2024
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 2 februari 2024
Vervaldatum: 3 maart 2024
Factuurnummer: 2417856
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202417856	€ 1.617,00

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
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Cc: [REDACTED] dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD11500202417856
Date: donderdag 28 maart 2024 16:55:41

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 02-02-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients" met aanvraagnummer AVD11500202417856. 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

De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze met elkaar in overeenstemming brengen?

In uw NTS onder 'In what procedures will the animals typically be used' noemt u de term 'euthanasie'. De CCD vindt dat de term doden een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u 'euthanasie' aanpassen in 'doding'?

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

Onduidelijkheden

In de bijlage dierproeven onder 'F. Classification of severity of procedures' noemt u dat een aantal dieren ook ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u de mate van ernstig ongerief benoemen in uw NTS?

Daarnaast noemt u dat 0,003% van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Dit komt niet overeen met de genoemde 1 op 300 dieren. Kunt u onder F. het juiste percentage weergeven van het aantal dieren dat ernstig ongerief ondergaat?

De aantallen dieren onder 'F. Classification of severity of procedures' per ongeriefclassificatie komen niet overeen met de aantallen genoemd in de NTS. Kunt u dit in overeenstemming brengen met elkaar?

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.

Mochten uw antwoorden voor vrijdag 5 april a.s. door ons ontvangen zijn, kunnen deze

worden meegenomen tijdens de inhoudelijke bespreking van uw dossier in de vergadering van de CCD.

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

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

.....
T: 0800 789 0789
E: 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.

Maurice Overzier, Centrale Commissie Dierenproeven

Date 18 April 2024
Concerns Answers to questions of the DEC on project AVD1500202417856



Division Surgical Specialties

Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery department

Dear 

With this letter we would like to submit our answers to the questions given by the DEC to our project proposal and NTS on 28/03/2024. The questions and answers can be found in the next page of this file.

Most sincerely,

Otorhinolaryngology department,
UMC Utrecht

Visiting address:
Heidelberglaan 100
3584 CX Utrecht
The Netherlands

Mailing address:
Internal mail number Type no.
Room number Type no.
P.O. Box 85500
3508 GA Utrecht
The Netherlands

Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients,
AVD11500202417856

Vragen:

De DEC heeft uw projectaanvraag en NTS op 28-03-2024 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen:

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze met elkaar in overeenstemming brengen?

Antwoord: Dear committee, we thank you for this question. We have made the changes to reconcile both documents.

In uw NTS onder 'In what procedures will the animals typically be used' noemt u de term 'euthanasie'. De CCD vindt dat de term doden een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u 'euthanasie' aanpassen in 'doding'?

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

Antwoord: Dear committee, we thank you for the questions. We have made the changes in the term euthanasie and have replaced them for doding.

Onduidelijkheden

In de bijlage dierproeven onder 'F. Classification of severity of procedures' noemt u dat een aantal dieren ook ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u de mate van ernstig ongerief benoemen in uw NTS?

Daarnaast noemt u dat 0,003% van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Dit komt niet overeen met de genoemde 1 op 300 dieren. Kunt u onder F. het juiste percentage weergeven van het aantal dieren dat ernstig ongerief ondergaat?

De aantallen dieren onder 'F. Classification of severity of procedures' per ongeriefclassificatie komen niet overeen met de aantallen genoemd in de NTS. Kunt u dit in overeenstemming brengen met elkaar?

Antwoord: Dear committee, we thank you for the questions. We have made the necessary changes in the number per discomfort in the NTS so that it goes in line with the numbers in the appendix. We have indeed made a mistake in the percentage. The percentage has been corrected to 0,3 but the numbers have not been adjusted because I had already approximated upwards. The correct math is included now in the appendix.



> 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
AVD11500202417856

Bijlagen

3

Datum 19 april 2024

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 2 februari 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients" met aanvraagnummer AVD11500202417856. 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 22 april 2024 tot en met 1 januari 2029.

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 januari 2030 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:

19 april 2024

Aanvraagnummer:
AVD11500202417856

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 26 maart 2024. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 28 maart 2024 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de genoemde doelcategorieën, verhullend taalgebruik en het ongerief genoemd in de NTS en de berekening van het ongerief in de bijlage dierproeven. 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.

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 januari 2030 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.

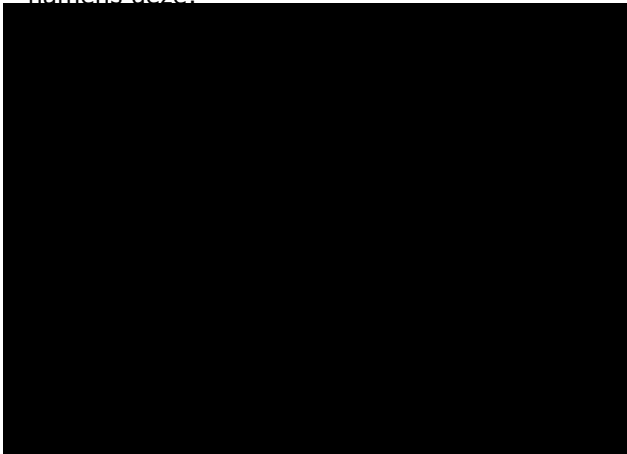
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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, stuur een e-mail naar 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

Datum:

19 april 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202417856



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 22 april 2024 tot en met 1 januari 2029, voor het project "Stem cells from the inner ear: promoting regeneration in otorhinolaryngology patients" met aanvraagnummer AVD11500202417856, na advies van dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Post-doc. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is KNO-arts verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 2 februari 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 19 april 2024;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Manipulation of specific signaling pathways after deafening to promote hair cell regeneration, zoals ontvangen op 19 april 2024;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 19 april 2024;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 26 maart 2024
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 19 april 2024.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Manipulation of specific signaling pathways after deafening to promote hair cell regeneration			
	Muizen (Mus musculus) / C57Bl/6J	1.234	0,2% Ernstig 69,4% Matig 30,4% 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 te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer: AVD11500202417856

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:

AVD11500202417856

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:
AVD11500202417856

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.