

Inventaris Wob-verzoek W22-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS202011187-1	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Begeleidend schrijven bij melding				x		x		x	
2	aanvraag projectvergunning dierproeven				x		x		x	
3	bijlage dierproeven				x				x	
4	aanvraag projectvergunning dierproeven natte handtekening, d.d. 24 februari 2021				x		x		x	
5	Ontvangstbevestiging melding, d.d. 24 februari 2021				x		x		x	

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Bijgaand sturen wij u de formulieren voor een melding op aanvraag AVD ^{5.1 lid2h} 202011187: Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel.

Ingangsdatum van de verandering is 11 januari 2021.

In deze melding willen wij het gebruik van een niet in de originele aanvraag beschreven muisstam toevoegen, te weten: Mdr1a/b-Bcrp constitutieve knock-out. Dieren die homozygoot zijn voor alle drie knock-out-mutaties zijn gezond en ontwikkelen zich normaal. Het totaal aantal dieren in bijlage 2 verandert hierdoor niet. Met ons is de IvD van mening dat door de toevoeging van deze muisstam het cumulatieve ongerief voor de dieren onveranderd is, waardoor we met een melding kunnen volstaan. Omdat de oorspronkelijke NTS nog steeds een correcte weergave geeft van het vergunde project, is geen aangepaste NTS bijgevoegd.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e



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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 5-1 lid2h

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2 5-1 lid2h 202011187

1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie				
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw

E-mailadres contactpersoon				
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

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer

Postcode en plaats

Postbus, postcode en plaats

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	

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

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef 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 checked="" type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6
		Gebruik van een niet in originele aanvraag beschreven muisstam: Mdr1a/b-Bcrp constitutieve knock-out. Dieren die homozygoot zijn voor alle 3 de knock-out-mutaties zijn gezond en ontwikkelen zich normaal. Ingangsdatum 11 januari 2021.

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	-	-
		Einddatum (t/m)	-	-
3.2	Wat is de titel van het project?			
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?			
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC		
		Postadres		
		E-mailadres		

4 Factuurgegevens

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

Naam:		Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:		
Postbus:	Postcode:	Plaats:	
E-mail:			

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

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven
<input 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	5.1 lid2e
Functie	5.1 lid2e
Plaats	5.1 lid2h
Datum	- -
Handtekening	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
------------	----------------

2	Distributie en effecten van potentiële nieuwe CNS-geneesmiddelen in ziektemodellen
---	--

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Januari 2021:

In deze melding willen wij het gebruik van een niet in de originele aanvraag beschreven muisstam toevoegen, te weten: Mdr1a/b-Bcrp constitutieve knock-out. Dieren die homozygoot zijn voor alle drie knock-out-mutaties zijn gezond en ontwikkelen zich normaal. Het cumulatieve ongerief neemt hierdoor dus niet toe. De aantallen dieren blijven onveranderd ten opzichte van de originele aanvraag. Ingangsdatum van de toevoeging van deze stam is 11 januari 2021. Toevoegingen in de tekst zijn hieronder in blauw aangegeven.

In experimenten uitgevoerd onder deze bijlage worden dezelfde experimentele handelingen als in bijlage 1.3.1 uitgevoerd maar dan met diermodellen voor een CNS-gerelateerde aandoening. De hier aangevraagde experimenten zijn erop gericht om in vivo informatie over de biologische distributie/kinetiek en de farmacodynamiek van potentiële geneesmiddelen te verkrijgen. Deze informatie wordt gebruikt om de selectie van kandidaten te ondersteunen voor verdere ontwikkeling tot een geneesmiddel tegen een ziekte van het CNS. Aangezien deze ziektes de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten is het in bepaalde gevallen noodzakelijk om gebruik te maken van transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziektes.

Als een klant ons vraagt een studie in een ziektemodel uit te voeren én

- a) er voldoende kennis over PK en PD in wildtypedieren vergaard is (hetzij door studies door de onderzoeker zelf, hetzij door studies door / in opdracht van de klant) en
- b) deze waarden zodanig zijn dat het kandidaatgeneesmiddel verder ontwikkeld kan worden, en
- c) het potentiële geneesmiddel gericht is tegen een ziekte waarvoor in de gebruikte species rat of muis een goed gekarakteriseerd ziektemodel beschikbaar is, en

- d) redelijkerwijs te verwachten is dat PK en/of PD in de patiënt en het ziektemodel af zou kunnen wijken van die in het gezonde organisme, en
- e) we het ongerief van de te testen dieren in kunnen schatten, en
- f) de voorgestelde studie binnen vergunning past;

Dan kan een studie in een relevant ziektemodel gepland en uitgevoerd worden om hierin de farmacokinetiek (distributie) en farmacodynamiek (effecten) te bepalen.

Experimentele aanpak

Om later herhaald monsters te kunnen nemen uit een of meerdere hersengebieden, cerebrospinale vloeistof (CSF) en/of bloed worden dieren tijdens een operatie voorzien van (een) microdialyseprobe(s), dan wel guide-canule(s), met eventueel een canule in de cisterna magna en/of katheter in de vena jugularis/femoralis.

Daarnaast worden kandidaatstoffen toegediend om hun farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen te kunnen bepalen. Toediening geschiedt afhankelijk van de eigenschappen van de kandidaatstof en de vraagstelling van de klant bijvoorbeeld *per os*, intraveneus, intraperitoneaal of intracisterna-magna en, ook weer afhankelijk van de eigenschappen van de kandidaatstof en de vraagstelling, eenmalig of (sub-)chronisch.

Na de implantatie kunnen vanaf de volgende dag gedurende meerdere uren (tot dagen) monsters verzameld worden zonder dat de dieren veel gestoord worden. Daarna worden primaire uitkomstparameters *ex vivo* veelal met behulp van massaspectrometrie of ELISA bepaald.

Primaire uitkomstparameters

- Farmacokinetiek van de kandidaatstof: aanwezigheid (kwalitatief) en concentratie (kwantitatief) in vloeistofmonsters uit (verschillende) targethersengebied(en), CSF, en/of bloed over de tijd na toediening van de kandidaatstof.
- Farmacodynamiek van de kandidaatstof: concentratie van biomarkers in (verschillende) targethersengebied(en) over de tijd, in reactie op de toediening van kandidaatstof(fen).
-

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

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

• Acclimatisatiefase:

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

• Voedselrestrictie *:

Het kan in een enkel geval voorkomen dat de dieren bij orale toediening van de kandidaatstof "nuchter" moeten zijn. In deze gevallen zullen de dieren gedurende maximaal 8 uur voor toediening gevast worden. Aangezien de meeste toedieningen in de ochtend plaatsvinden, en de microdialyse daaropvolgend gedurende de dag, zal deze voedselrestrictie in de actieve periode van de dieren plaatsvinden. Er is gekozen voor een maximum van 8 uur omdat een vastenperiode van 6 tot 7 uur bij ratten en muizen vaak resulteert in een vergelijkbare maaglediging als bij langere vastenperiodes (bv. Prior et al., 2012; Hauff & Nebendahl, 2017). Hierbij wordt alleen het voer weggenomen, de dieren hebben *ad libitum* toegang tot drinkwater. Dit is, net als bij al toegelaten geneesmiddelen, afhankelijk van stofspecifieke eigenschappen en gebeurt alleen als er al gegevens over de kandidaatstof bekend zijn dat dit voor opname van de stof noodzakelijk is. Ter indicatie, in het verleden betrof dit hooguit 1 of 2 studies per periode van 5 jaar. De verwachting is dus, dat voedselrestrictie hoogstens maar bij enkele studies nodig zal zijn.

• Implantatie van microdialyseprobe(s) met of zonder cisterna magna canule en/of vena jugularis/femoralis katheter

Voor het uitvoeren van een microdialyse-experiment worden één of meerdere probes chirurgisch in de

hersenen aangebracht. Het plaatsen van de probes vindt altijd onder diepe (inhalatie) anesthesie plaats, in combinatie met een systemisch analgeticum en topicale anesthesie, op een verwarmde ondergrond en met individuele temperatuurcontrole indien de te verwachten operatieduur meer dan 30 minuten is.

Afhankelijk van de vraagstelling wordt de meest geschikte probe gekozen:

- de conventionele probe, geschikt voor collectie van neurotransmitters en "small molecules",
- de **5.1 lid2h** probe, waarmee absolute concentraties van stoffen kunnen worden bepaald (veel gebruikt voor de PK van kandidaatstoffen),
- de push-pull probe, deze is door zijn poriegrootte zeer geschikt voor het bemonsteren van grotere (eiwit) biomarkers en "large molecules"

De coördinaten voor de plaatsing van de probe(s) worden vooraf bepaald op basis van het te bemonsteren hersengebied met behulp van een relevante stereotactische hersen-atlas:

- Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, compact 6th edition, 2009
- Franklin K.B.J. and Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, compact 3rd edition, 2008

- Boven het doelgebied in de hersenen wordt een zo klein mogelijk incisie gemaakt in de hoofdhuid.
- Topicaal anestheticum wordt aangebracht, inwerktijd ca. 5 minuten.
- Periost wordt verwijderd.
- Met een trepaanboor worden verdiepingen in de schedel geboord waar schroefjes in gezet kunnen worden waaraan (zie h) de probe kan worden vastgezet.
- Met een trepaanboor wordt een gaatje door de dorsale zijde van de schedel geboord, boven het hersengebied.
- De meninges worden voorzichtig met de tip van een naald geopend.
- Met behulp van een stereotactisch frame wordt een microdialyseprobe (of een "guide-canule", een speciaal hiervoor ontworpen houder, met daarin een probe of een stilet; in het geval van herhaalde, langdurige, of uitgestelde microdialyse) exact boven het hersengebied gepositioneerd en langzaam in de hersenen naar binnen gebracht met een vloeiende draaibeweging van de micromanipulator op de stereotact.
- De probe of guide-canule wordt met schroefjes en een speciaal biocompatibel polymeer vastgezet op de schedel.

Wanneer het nodig is om stofconcentraties in de verschillende compartimenten (bloed, hersenen, CSF) te bepalen wordt tijdens dezelfde operatie een katheter of canule aangelegd in de bloedbaan of de cisterna magna.

- Voor het nemen van bloedmonsters (of bloeddialysaatmonsters) wordt de katheter geplaatst in de vena jugularis of de vena femoralis. Het uiteinde van de katheter wordt op de schedel bevestigd op vergelijkbare wijze als bij de microdialyseprobes.
- Voor het nemen van CSF-monsters wordt een canule geplaatst in de cisterna magna, op dezelfde wijze als de plaatsing van microdialyseprobes.

Na plaatsing van de probe(s) en eventueel katheter en/of canule (implantaten) wordt de incisie gesloten, waarna de dieren rustig kunnen bijkomen van de anesthesie. Afhankelijk van het aantal te plaatsen implantaten duurt de operatie per dier tussen 20 en 90 minuten. Tijdens de recovery worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtematje en gemonitord. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, worden ze individueel in experimentele kooien gehuisvest om beschadiging van elkaars operatiewond of implantaten te voorkomen. Waar mogelijk worden de dieren zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken; bij langer durende individuele huisvesting is dat tot de overbrenging in experimentele kooien zoveel mogelijk per paar in een kooi met een geperforeerde perspex scheidingswand voor beperkt contact zonder dat de implantaten kunnen worden beschadigd en daardoor het experiment gevaar kan lopen.

• **Extra behandeling bij induceerbare modellen: inductie van het ziektemodel ***

Verschillende ziektemodellen worden geïnduceerd in gezonde wildtypedieren. Hierbij is de inductie een extra behandeling.

- Bij experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE), model voor de demyeliniserende ziekte

multiple sclerose, worden de dieren op twee verschillende plekken subcutaan geïnjecteerd en 1-6 uur later en 24 uur later nog een keer intraperitoneaal. Dit is een totaal van 4 injecties.

Bij 6-OHDA-laesie van dopaminerge neuronen wordt het neurotoxine 6-hydroxydopamine tijdens een stereotactische operatie (zie hierboven) m.b.v. een Hamilton-spuit geïnjecteerd in een hersengebied met dopaminerge neuronen. Anesthesie en analgesie als bij de stereotactische operatie.

- **Toediening van kandidaatstof, vehikel, en/of referentiestof:**

Het individuele dier wordt één of meerdere keren (maximaal 60 keer in totaal, bijv. 2 maanden dagelijks, of 1 maand tweemaal daags) een dosering van de teststof(fen) (kandidaatstof of vehikel, en/of referentiestof) toegediend. Als naast de kandidaatstof ook een bekende receptor (ant)agonist als referentiestof toegediend wordt, kan hiermee ook informatie over het werkingsmechanisme van de kandidaatstof verkregen worden. De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de kandidaatstof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Onverdoofd: intraperitoneaal, subcutaan, oraal (per gavage of in het dieet), intraveneus (eventueel via geplaatste katheter), lokaal door de microdialyseprobe (alleen van toepassing bij PD).

Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de kandidaatstof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:

- Onverdoofd: intramusculair, rectaal, intranasaal.

- Onder anesthesie (bij voorkeur worden deze administraties gedaan tijdens de bovenbeschreven operatie, en zullen vooral relevant zijn voor biological kandidaatstoffen zoals AAV-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, toedieningen in specifieke organen (zoals bijvoorbeeld intracardiaal).

De keuze voor de toedieningsroute vindt voor iedere studie in de planningsfase plaats, waarna de onderzoeksopzet aan de IvD wordt voorgelegd. Mocht in een studie een gekozen toedieningsroute ontoereikend of ongeschikt blijken (bv. onvoldoende recovery van de kandidaatstof in de offline analyse van de microdialysemonsters na een PK-studie), dan kan in overleg met de klant besloten worden dat de onderzoeker een vervolgstudie ontwerpt met een andere toedieningsroute, die vanzelfsprekend ook weer aan de IvD wordt voorgelegd.

Waar van toepassing worden richtlijnen voor administratie uit de literatuur gebruikt, bijvoorbeeld "Handboek proefdierkunde" door L.F.M. van Zutphen (2009), Diehl et al (Journal of Applied Toxicology (2001) 21:15-23). Toedieningstechnieken worden uitgevoerd volgens gestandaardiseerde en getrainde werkinstructies.

Veelal zal de toediening van de kandidaatstof(fen), referentiestof(fen) of vehikel na een aantal basale monsters tijdens de microdialyse plaatsvinden om pre- met postdoseringmonsters te kunnen vergelijken. Bij (sub)chronische toediening of als sprake is van langetermijneffecten kan toediening ook al voor de implantatie van de microdialyseprobe(s) aanvangen.

De toediening zal in de meeste gevallen in de eerste uren van de lichtfase plaatsvinden. Indien de activiteit van het dier bepalend is voor de neurofysiologie van het mechanisme waar de kandidaatstof op aangrijpt en dus de transleerbaarheid naar de mens volgens ons in het gedrang komt, hebben we de mogelijkheid het dag-nacht-ritme van de dieren om te keren. In overleg met de klant beslist de onderzoeker over de noodzakelijkheid hiervan.

- **Klinische observaties**

Na de operatie en na toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd. Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom in de interne SOP Animal discomfort and humane endpoints. Bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

- **Microdialyse**

16 tot 18 uur na afloop van de operatie is de bloed-hersenbarrière gesloten, wordt geen interferentie meer verwacht en kan de microdialyse gestart worden. Bij de dieren in de experimentele kooien worden de geïmplanteerde microdialyseprobes via slangetjes met een microperfusiepomp buiten de kooi verbonden. Tijdens het bemonsteren stroomt een iso-osmotische vloeistof door de probe, met een snelheid van 0,1 tot

enkele microliters per minuut. De uitstromende vloeistof uit de outletslangetjes wordt per dier en per hersengebied opgevangen om tot bijv. 10-, 15-, 30-, 60-, of 240-minutenmonsters te komen. De bemonsteringssnelheid is afhankelijk van de vraagstelling van de klant en van de al bekende eigenschappen van de kandidaatstoffen. Voordat de experimentele monsters verzameld worden, is er een stabilisatiefase van 1,5 tot 2 uur, waarin de dieren wennen aan de slangetjes en de niveaus van biomarkers in de opgevangen monsters stabiliseren. Over het algemeen worden eerst alle monsters verzameld en opgeslagen en vervolgens met behulp van bijvoorbeeld high-performance liquid chromatography (HPLC) gevolgd door tandem-massaspectrometrie geanalyseerd. Zodra de probe op de microperfusiepomp is aangesloten, moet continu worden geperfuseerd met de iso-osmotische vloeistof om dezelfde probe te kunnen blijven gebruiken. Daarom wordt in sommige gevallen in plaats van de probe zelf een zogenaamde guide-canule geïmplant. Door een guide-canule kan (door weefselschade en activatie van microglia) maximaal tweemaal hetzelfde hersengebied met een nieuwe probe gedurende 24 uur worden bemonsterd. Kort voor de eigenlijke microdialyse (meestal 1 dag ervoor) wordt bij het wakkere dier een precies passende microdialyseprobe in de guide-canule geplaatst. (1) Als herhaald bemonsterd moet worden, bijvoorbeeld aan het begin en einde van een (sub)chronische toediening van kandidaatstof, kan de probe na de eerste microdialyse-sessie vervangen worden door een stilet, die weer vlak voor de tweede microdialyse-sessie door een nieuwe microdialyseprobe vervangen wordt. (2) Ook als de microdialyse pas verschillende dagen tot weken na de implantatie plaatsvindt, is de implantatie van een guide-canule (met stilet die kort van tevoren vervangen wordt door de eigenlijke probe) de aangewezen manier om tot betrouwbare bemonstering te komen. (3) Als gedurende meer dan 30 uur onafgebroken moet worden bemonsterd, is het ook zekerder om een guide-canule te implanteren, zodat als een probe na zo lange tijd eventueel verstopt raakt, deze vervangen kan worden en daarmee het betrokken dier niet voortijdig getermineerd zou moeten worden.

Bij sommige studies wordt tijdens de microdialyse ook bloed en/of CSF verzameld (zie navolgende punten).

- **Verzameling bloedmonsters ***

Bloedafname voor en/of na toediening van de kandidaatstof gebeurt via de staartvene (voorkeur bij rat), aangezichtsvene (voorkeur bij muis), en bij herhaaldelijke monsterafname door de geplaatste katheter in de vena jugularis/femoralis. De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een interne SOP en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Eventuele herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Vanwege de veelal korte experimenten zal er na het afnemen van deze volumina vaker sprake zijn van termineren dan van herstel. Als leidraad voor de interne SOP is gekeken naar Diehl (2001), deze geeft in tabel 4 aan dat bij meerdere monsternames tot 20% kan worden afgenomen in 24h met 3 weken herstel. Samengevat richten wij ons dus op een maximum van 10% van het totaal bloedvolume, wanneer dit wordt overschreden wordt met de klant gesproken over de noodzaak van grotere volumina. Wanneer deze noodzaak aantoonbaar is, is 20% de uiterlijke bovengrens. Bij een afname van boven de 10% wordt vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) gegeven.

- **Verzameling cerebrospinale vloeistof ***

Indien nodig kunnen in de periode na toediening ook CSF-monsters worden verzameld om farmacokinetische en farmacodynamische parameters te bestuderen. Deze monsters worden genomen door de geplaatste canule in de cisterna magna. De afname van CSF-monsters is beperkt tot 4 monsters van 7-10 µl van een muis en 8 monsters van 10-20 µl van een rat per 24 uur. Door de CSF-productie van 0.3 µL per minuut in de muis en meer bij grotere diersoorten wordt de afgenomen vloeistof ruimschoots weer aangevuld (Partridge, Expert Opin Drug Deliv 2016: 13, 963-975).

Terminatie

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat, zodat de hersenen kunnen worden verwijderd om de plaatsing van de probe(s) te verifiëren. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminaal CSF worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. In enkele

gevallen, wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcaderiale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol.

De gebruikte methoden voor implantatie, toediening, monsterafname, anesthesie, euthanasie, bloed-CSF, uitname van hersen- en ander weefsel zijn gedocumenteerd in standaardprocedures.

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

Het aantal dieren dat nodig is voor een experiment is afhankelijk van de vraagstelling en de uiteindelijk te bepalen uitkomstparameter(s). Op basis van een statistische poweranalyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte voor de verschillende typen experimenten berekend. Dit loopt uiteen van 4 tot 16 dieren per dosering (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of kandidaatstof, hierbij is ook het te bemonsteren hersengebied van belang, en wordt getoetst met een poweranalyse).

- Voor farmacokinetische studies met behulp van een ultra langzame flow (in onze gepatenteerde **5.1 lid2h** zijn minimaal data van 4 dieren nodig, in combinatie met bloed- en CSF-afname adviseren wij de klant een aantal van 5 dieren.

- Voor de klassieke neurotransmitters (monoamines en aminozuren) zijn 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.

- Voor neurotransmitters waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zoals histamine en acetylcholine, zijn 7 tot 8 dieren nodig.

- Voor studies aan metaboliëten van de kynurenine-pathway zijn 7 tot 8 dieren nodig.

- Voor studies aan eiwitten zijn 8 tot 12 dieren nodig.

- Wanneer voor de navolgende analyse(s) veel plasma of CSF moet worden verzameld, kan bij muizen de groepsgrootte oplopen tot 16 dieren.

- Voor niet eerder geteste biomarkers zal eerst op basis van een pilotstudie de bioanalytische variatie moeten worden bepaald om de groepsgrootte voor een volledige studie te kunnen bepalen. Hierbij wordt voor t-tests, bijvoorbeeld bij het vergelijken van area-under-the-curve (AUC), een poweranalyse volgens <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> gebruikt met een alfa van 0,05 en een power (1-beta) van 0,8. Voor gecompliceerdere experimenten, zoals repeated measures ANOVA, gebruiken we ook de online beschikbare software G*Power (<https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>).

Het aantal groepen in een experiment wordt geminimaliseerd door het studie-ontwerp goed op te zetten:

- Doseringen worden gekozen op basis van de voorhanden zijnde informatie over de kandidaatstof. Voor de bepaling van farmacokinetiek is niet altijd een controlegroep (vehikel) nodig.

- Tijdstippen goed kiezen, zodat er zo min mogelijk monsters hoeven worden verzameld, maar wel alle relevante tijdstippen meegenomen worden op basis van kennis over de werking van de kandidaatstof en het moleculaire target.

- Goede randomisatie, waar mogelijk blinderen van de experimentator, gebruik van pilotgroepen en toedieningen bij verschillende dieren verspreid over de dag, waardoor bij eventuele negatieve gevolgen voor het dierwelzijn tijdig ingegrepen kan worden en eventueel de experimentele opzet herzien.

Ons streven is altijd om betrouwbare resultaten te vinden met gebruik van zo min mogelijk dieren.

Het aantal benodigde dieren in deze bijlage wordt tot een minimum beperkt door in studies uit bijlage 1.3.1 eerst de PK en PD van de kandidaatstof in gezonde dieren te bepalen.

B. De dieren

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

Diersoorten

Onze instelling heeft expertise in het toepassen van de microdialysetechniek in muizen en ratten. De experimenten in deze bijlage worden uitsluitend met relevante ziektemodellen uitgevoerd. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welk ziektemodel het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief).

Herkomst

Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.

Geslacht en levensstadium

Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Desondanks zien we dat het merendeel van de gebruikte dieren nog steeds mannelijk zijn. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde *in vivo* studies of opvolgende *in vivo* studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

In de meeste studies worden (jong)volwassen dieren ingezet. Vaak is dat voor de klant een relevante leeftijd. Verder zijn de stereotactische operaties die wij uitvoeren bijv. qua coördinaten voor volwassen dieren geoptimaliseerd. Ook is er bij volwassen dieren meer ruimte op de schedel om de verschillende probes vast te zetten, waardoor bij meerdere meetgebieden het aantal dieren zo laag mogelijk gehouden kan worden. Daarom vinden de implantaties bij voorkeur bij (jong)volwassen dieren plaats, vanaf een leeftijd van 8 weken, bij een gewicht van 250-350 gram voor ratten en 20-25 gram voor muizen. Wanneer dat voor de studie-opzet noodzakelijk is, kunnen dieren tot maximaal 18 maanden geopereerd worden, met bij ratten aangepaste coördinaten volgens Tabel 1 in de bovengenoemde hersenatlas.

Om aan veroudering gerelateerde ziektes te bestuderen worden soms ook oudere dieren ingezet, of juist pasgeboren dieren wanneer het gaat om een genetische afwijking die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met een passende therapie. In dat laatste geval zal het dan gaan om toediening op of vanaf de vroeg postnatale leeftijd, terwijl de probe-implantatie en de daaropvolgende microdialyse in het (jong)volwassen dier zullen plaatsvinden. In het intakeformulier voor een studie (study information data sheet, SIDS) wordt de klant specifiek gevraagd de keuze voor het diermodel, leeftijd en geslacht te motiveren. Waar nodig wordt de klant naar de motivatie voor zijn keuze gevraagd en bij zijn keuze geadviseerd.

Diermodel met ontbrekende transporter-eiwitten

- Mdr1a/b-Bcrp constitutieve knock-out muis. In deze GGO-muis zijn de genen (Abcb1a, Abcb1b en Abcg2) voor drie transporter-eiwitten, Mdr1a, Mdr1b en Bcrp, gericht gemuteerd zodat de eiwitten niet geproduceerd worden. Deze transporter-eiwitten, die zich onder andere in de bloed-hersenbarrière bevinden, zijn in staat om substraten door de celmembraan te transporteren en zo af te voeren. Bij verschillende hersenziekten zijn veranderingen in de bloed-hersenbarrière te vinden, waaronder dysfuncties in deze transporters (bv. Qosa et al, Brain Res 2015). Daardoor kunnen deze muizen als een (deel)model voor bv. de ziekte van Parkinson of multiple sclerose dienen. Dieren die homozygoot zijn voor alle drie knock-out-mutaties zijn gezond en ontwikkelen zich normaal.

Ziektemodellen

Relevante ziektemodellen zijn veelal voor neurodegeneratieve ziektes. Dieren uit deze modellen ontwikkelen, net als patiënten met deze ziektes, symptomen als progressieve motorische beperkingen, veranderde activiteit, en gewichtsafname. De dieren worden vanaf het moment van aankomst in ons vivarium dan wel vanaf inductie van het ziektemodel dagelijks gemonitord en wekelijks gewogen. Bij gemeten gewichtsafname kan ervoor gekozen worden om vaker te wegen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD, waar nodig met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekten waarvoor met enige regelmaat modellen ingezet zijn, en naar verwachting ingezet zullen worden:

• Ziekte van Alzheimer

- 5xFAD Tg muis (amyloid). Deze GGO-muis heeft hersenspecifieke overexpressie (via Thy1-promoter) van 5 Familial Alzheimer's Disease (FAD) mutaties: humaan amyloid beta precursor proteïne met 3 FAD-mutaties en humaan presenilin-1 met 2 FAD-mutaties, en is daarmee een model voor amyloid-pathologie bij de ziekte van Alzheimer. Vanaf ongeveer 2 maanden treden

amyloid plaques en neurodegeneratie op. Vanaf 4-5 maanden vertonen de dieren een verslechterd ruimtelijk werkgeheugen en verminderd angstgedrag. Lager lichaamsgewicht en motorische zwakte treden pas later op, tussen 6 en 9 maanden, terwijl exploratief gedrag tot minstens 12 maanden normaal lijkt. Cognitieve symptomen doen zich voor vanaf 3-6 maanden en worden sterker bij het ouder worden. Deze dieren worden beoordeeld naar de algemene interne beslisboom dierenwelzijn. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).

- Tg(tauP301L)4510 muis. Deze GGO-muis heeft hersenspecifieke overexpressie (via Thy1-promoter) van humaan tau-eiwit met de P301L-mutatie. Deze dieren ontwikkelen vanaf 6 maanden neurofibrillaire tangles. Motorsymptomen zijn vrij subtiel, maar de gemiddelde levensduur is minder dan 12 maanden. Alzheimer-achtige symptomen ontwikkelen zich vanaf 5-6 maanden. Deze dieren worden beoordeeld aan de hand van een interne modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).

- **Ziekte van Huntington**

- Q175 KI muis. In deze GGO-muis is exon 1 van het Huntingtin (htt) gen vervangen door een humaan exon 1 met 180-220 CAG-herhalingen. Deze dieren vertonen Huntington-achtige symptomen vanaf rond 36 weken (naar eigen ervaring niet voor 20 weken), hoewel vanaf 2 maanden al subtiel verminderde gewichtstoename en activiteit (in de donkerfase) ten opzichte van wildtypedieren gezien zijn. Duidelijkere motorische symptomen, met tremors, lagere activiteit, hunching, piloerectie en afnemend lichaamsgewicht (voornamelijk mannelijke dieren) en lagere lichaamstemperatuur treden pas later op. In dit model wordt weinig claspings gezien en sterfte treedt bij deze lijn pas na ruim een jaar op. Deze dieren worden beoordeeld aan de hand van een modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch). Wij gebruiken bij voorkeur deze muis en niet de veelgebruikte R6/2, omdat daar het ziekteverloop erg zwaar en snel is.
- R6/2 muis. Deze GGO-muis heeft een overexpressie van het humane Huntingtin (htt) gen met ongeveer 120 CAG-herhalingen. Deze dieren vertonen Huntington-achtige symptomen die vanaf een maand kunnen optreden en sterker zijn dan bij de Q175-lijn. Dieren ontwikkelen motorische symptomen, vaak beginnend met claspings. Verder treden tremoren op, chorea-achtige bewegingen, afnemend lichaamsgewicht en epileptische aanvallen. Sterfte treedt op vanaf 3 maanden en de meeste dieren sterven voordat ze 4 maanden oud zijn. Deze dieren worden beoordeeld aan de hand van een modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch), maar dieren uit dit model zullen niet na 13 weken getest worden.

- **Ziekte van Parkinson**

- mThy1-hSNCA, line 15 muis. Deze GGO-muis heeft een overexpressie van wildtype humaan α -synucleïne. De eerste Parkinson-achtige symptomen treden op vanaf ongeveer 2 maanden en de dieren worden beoordeeld naar de algemene interne beslisboom dierenwelzijn. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).
- Parkin KO rat. Deze GGO-rat heeft een prematuur stopcodon in het Parkin-gen, en daardoor geen functioneel eiwit. Deze dieren hebben veranderingen in dopaminerge signaalwegen vanaf 2 maanden, zonder neurodegeneratie tot minstens 8 maanden, en met maar kleine motorische afwijkingen tot minstens 8 maanden. De dieren worden beoordeeld naar de algemene interne

beslisboom dierenwelzijn. Het verwachte ongerief is afhankelijk van de leeftijd van de dieren (zie Tabel 1). Op welke leeftijd de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).

- Rat of muis met 6-OHDA-laesie. Dit is een chemisch geïnduceerd Parkinsonmodel. Door de unilaterale injectie (zie boven) van 6-OHDA ontstaat er een (partiële) laesie van de dopaminerge neuronen en treden snel na de operatie Parkinson-achtige symptomen op. Direct na de operatie vertonen de dieren unilateraal draaigedrag (richting afhankelijk van de zijde van injectie), afgenomen motor-activiteit en verminderd eet- en drinkgedrag. Een belangrijk welzijns criterium dat moet worden bijgehouden is daarom het gewicht van de dieren. Voor muizen licht het humane eindpunt daarbij bij een gewichtsverlies van 20%, bij ratten is dat 15% gewichtsverlies. De dieren worden beoordeeld aan de hand van een modelspecifieke beslisboom. Het verwachte ongerief is beschreven in Tabel 1. In welk stadium de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof (bijv. preventief of therapeutisch).
- **Multiple Sclerose: EAE-model in rat en muis**
 - Door de injecties (zie boven) van een antige-emulsie en pertussistoxine ontstaat actieve immunisatie en daardoor experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE) en demyelinisatie. Hoewel het precieze verloop symptomen van dier tot dier verschilt, beginnen de EAE-symptomen vaak tussen 9 en 14 dagen na immunisatie, met een maximum in de symptomen rond 3 tot 5 dagen na de eerste symptomen. Deze piek duurt 1 tot 3 dagen waarna vaak gedeeltelijk herstel optreedt. Voor dit model is een vijfpunts-scoremodel gangbaar en ook aanbevolen door producenten van de te injecteren antigenen. Humane eindpunten zijn daarin aangegeven en zullen worden opgevolgd: 0, geen symptomen; 1, slappe staart; 2, gedeeltelijke verlamming van de achterpoten; 3, complete verlamming van de achterpoten; 4, 3 met gedeeltelijke verlamming van de voorpoten; 5, stervende, gestorven of getermineerd. Halve punten zijn ook mogelijk en beschreven. Het verwachte ongerief is ook beschreven in Tabel 1. Dit model wordt vanwege het betrouwbaardere en meer homogene optreden van symptomen over het algemeen in vrouwelijke dieren geïnduceerd. Leeftijd bij inductie: 9-14 weken. In welk stadium na de inductie de dieren getest zullen worden is mede afhankelijk van het voorgestelde mechanisme van de kandidaatstof: vanaf de immunisatie voor profylactische effecten, vanaf het punt dat 10-20% van de dieren symptomen vertoont (semi-therapeutisch), individueel vanaf het tijdstip van de eerste symptomen (therapeutisch), of laat therapeutisch vanaf een vooraf bepaald aantal dagen na het optreden van de eerste symptomen.

In het geval een klant een studie wil laten uitvoeren met een ander model dan de hierboven genoemde modellen, zullen eventueel ook andere sterk gelijkende modellen ingezet kunnen worden, in overleg met de IvD. In het geval van nieuwe modellen zullen we, na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen.

Geschatte aantallen

In de laatste ~40 studies, uitgevoerd onder projectvergunning AVD 5.1 lid 2h is gewerkt met een groepsgrootte van 4-20 (gemiddeld 6), aantal groepen 1-8 (gemiddeld 3), en tussen 3 en 100 (gemiddeld 18-20) dieren per studie, waarvan 40% muizen en 60% ratten. Op basis daarvan is de volgende schatting gemaakt; bij 40 studies per jaar zijn dat maximaal 750 dieren per jaar, dus 3750 over een periode van 5 jaar voor de gehele projectaanvraag.

Gebaseerd op het gebruik van rond de 20% ziektemodellen van het totaal aantal dieren in de afgelopen jaren in projectvergunning AVD 5.1 lid 2h zijn de **geschatte aantallen voor deze bijlage: 300 muizen en 450 ratten (40% en 60% van totaal 750 dieren)**.

Tabel 1: Samenvatting van de naar verwachting in te zetten ziektemodellen, hun intrinsieke ongerief op verschillende leeftijden, en het te verwachten cumulatieve ongerief in een experiment. Deze tabel fungeert als richtlijn voor onderzoeker en IvD, er zijn gevallen denkbaar dat het daadwerkelijke ongerief anders wordt ingeschat.

N.B.: De Mdr1a/b-Bcrp drievoudige knock-out muis wordt niet in deze tabel opgevoerd, aangezien geen intrinsiek ongerief te verwachten is.

ziekte	model	intrinsiek ongerief op leeftijd		specifieke symptomen	cumulatief ongerief			referenties
					1 implantaat	2 implantaten	3-4 implantaten	
Alzheimer	5xFAD muis	2 mnd	geen-licht	-	matig	matig	n.v.t.	Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006
		5 mnd	licht-matig	geheugen (-), angst (-)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig-ernstig	motoriek (-), gewicht (-)	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
	Tg(tauP301L)4510 muis	2 mnd	geen-licht	-	matig	matig	n.v.t.	Dutschmann et al., 2010
		5 mnd	matig	gewicht (-), activiteit (-), motoriek (-), claspings (+)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig-ernstig	hunching (+), problemen met de bovenste luchtwegen	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
Huntington	R6/2 muis	1 mnd	geen-licht	-	matig	matig	n.v.t.	Mangiarini et al., 1996
		2 mnd	matig-ernstig	motoriek (-), gewicht (-), tremors, claspings, chorea, epilepsie	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
		5 mnd	n.v.t.	mortaliteit	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	
	Q175 KI muis	2 mnd	geen-licht	gewichtstoename (-), activiteit (-)	matig	matig	n.v.t.	Menalled et al., 2012
		5 mnd	licht-matig	motoriek (-), gewicht (-)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig-ernstig	motoriek (-), activiteit (-), gewicht (-), tremors, hunching	matig-ernstig	ernstig	n.v.t.	
Multiple Sclerose	EAE, 9-14 wk inductie, in rat of muis	1-8d na inductie	geen-licht	-	matig	matig	rat: matig	Thakker et al., 2007
		9-14d na inductie	licht-matig	slappe staart, zwakke achterpoten	matig	matig	rat: matig-ernstig	
		3-5d later	matig-ernstig	verlamming achter- en dan voorpoten	matig-ernstig	muis: ernstig rat: matig-ernstig	rat: ernstig	
Parkinson	mThy1-hSNCA, line 15 muis	2 mnd	licht	gewichtstoename (-), activiteit (-), motoriek (-)	matig	matig	n.v.t.	Choi et al., 2020; Fleming et al., 2004
		5 mnd	licht-matig	gewichtstoename (-), activiteit (-), motoriek (-)	matig	matig	n.v.t.	
		8 mnd	matig	gewichtstoename (-), activiteit (-), motoriek (-)	matig	matig-ernstig	n.v.t.	
	Parkin KO rat	2 mnd	geen-licht	-	matig	matig	matig	Dave et al., 2014
		5 mnd	licht	kleine motorische afwijkingen	matig	matig	matig	
		8 mnd	matig	kleine motorische afwijkingen	matig	matig	matig-ernstig	
	6-OHDA laesie in rat of muis	na inductie	matig	unilateraal draaien, motoriek (-), gewicht (-)	matig	matig	rat: matig-ernstig	Boix et al., 2018

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De vergunninghoudende instelling is actief betrokken bij het Nederlandse 3R-research centrum en heeft regelmatig contact met wereldwijde regelgevende instanties en het FELASA netwerk (Federation of European Lab Animal Science).

In het licht van de NCad-richtlijn 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek' worden studieontwerpen regelmatig herzien (in combinatie met veranderende richtlijnen of aanbevelingen) en op ad-hoc basis (in samenwerking met de klant) om beschikbare verfijningen op te nemen, om het aantal dieren te minimaliseren of de ernst van het ongemak te verminderen. Het bedrijf is actief betrokken bij sectoroverschrijdende initiatieven, gericht op het toepassen van de 3V's.

Vervanging

Op dit moment bestaat er geen goed geïsoleerd systeem waarmee de hersenen in al hun complexiteit en samenspel met andere organen kunnen worden bestudeerd. Vervanging van deze experimenten is daardoor slechts ten dele mogelijk. Het testen van een potentieel geneesmiddel moet uiteindelijk altijd gebeuren in een intact organisme, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de kandidaatstof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de *in vitro* gemeten reactie *in vivo* niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen kandidaatstoffen die in *in vitro* testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven. Wel bestaan er plannen om in de nabije toekomst hersen-organoïden te gaan kweken en te testen of deze bij onze studies gebruikt kunnen worden. Dit is een interessante ontwikkeling maar nog in een vroeg stadium. Uiteindelijk hopen we hiermee een deel van de dierexperimenten te kunnen vervangen. Immers, de organoïden kunnen een goed model zijn voor de hersenen, maar (nog) niet voor het geheel van lichaam en hersenen en de bloed-hersenbarrière.

Vermindering

Allereerst wordt het aantal te gebruiken dieren verminderd doordat kandidaatstoffen voordat ze in dieren getest worden, eerst *in vitro* gekarakteriseerd, veelal bij de klant of bij andere 5.1 lid 2h. Zonder deze gegevens wordt een stof niet aan een dier toegediend. Om het gedrag van de te testen kandidaatstof (potentiële geneesmiddel) in het gekozen bemonsteringssysteem (microdialyseprobes) en de meetbaarheid met de *ex vivo* meetmethodes (veelal massaspectrometrie) te bepalen, wordt bij microdialyse ten behoeve van PK eerst een *in vitro* microdialyse doorgevoerd alvorens de kandidaatstof in dieren te testen.

In vergelijking tot methoden waarbij op elk tijdstip dieren moeten worden getermineerd om hersenextracten te prepareren zijn er bij de microdialysetechniek veel minder dieren nodig om op verschillende tijdstippen gegevens te verzamelen over de biodistributie (PK) en/of effecten (PD) van een kandidaatstof. Als PK en PD binnen één studie gecombineerd gemeten kunnen worden (niet altijd mogelijk vanwege bijv. verschillende probe-eigenschappen, of niet wenselijk vanwege bijv. eerst dosisbepaling), vermindert het aantal proefdieren dat nodig is in de preklinische fase nog sterker. Deze strategie biedt tevens het voordeel dat de aan elkaar verbonden data (uit hetzelfde dier) betere informatie leveren dan wanneer de data uit verschillende dieren zouden worden verzameld. Door verder ontwikkeling van de post

mortem offline analysemethodes kunnen steeds meer analyten per monster gemeten worden, waardoor het aantal benodigde dieren verder vermindert. Ook zijn de operatietechnieken verder ontwikkeld waardoor meer probes per dier geïmplanteerd kunnen worden.

Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, te bemonsteren hersengebieden en eventuele andere monsters, kandidaatstofconcentraties en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in het experimenteel ontwerp randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we monsters missen voor bepaalde tijdstippen. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere kandidaatstoffen hetzelfde vehikel voor alle kandidaatstoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.

Verfijning

Door een diermodel te gebruiken dat aansluit bij voorgaande en geplande studies met dezelfde kandidaatstof en bij de eisen van de wetgever aan onderzoek aan potentiële geneesmiddelen, en natuurlijk de mogelijkheid biedt om relevante parameters voor de hersenfysiologie van de mens te meten wordt per studie dat diermodel gekozen dat het meest verfijnd antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten komen in bepaalde gevallen de meest relevante data uit transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten (zie bijlage 1.3.2).

Microdialyse is ook een verfijnde methode omdat na de implantatie van de probes herhaalde monsters uit een anderszins slecht bereikbaar orgaan als de hersenen genomen kunnen worden zonder het dier te storen. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.

Specifiek voor de studies in deze bijlage is dat er eerst zowel onderzoek naar *in vitro* eigenschappen gedaan moet zijn als *in vivo* farmacokinetiek en farmacodynamiek in gezonde dieren (bijv. in studies uit bijlage 1.3.1), alvorens ziektemodellen ingezet worden.

Het onderzoek in deze aanvraag is gericht op geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel. Aangezien deze ziekten bijvoorbeeld de bloed-hersenbarrière kunnen aantasten of de werkzaamheid van een kandidaatstof alleen vastgesteld in een ziek systeem vastgesteld kan worden, zijn transgene of chemisch geïnduceerde diermodellen voor deze ziekten soms het meest verfijnde model om de verdeling en ook de werkzaamheid van potentiële geneesmiddelen te onderzoeken.

Aangezien bij deze ziektemodellen intrinsiek ongerief op kan treden, analoog aan de symptomen bij patiënten met dezelfde ziekte, wordt extra gelet op tekenen van ongerief bij de dieren en waar nodig extra verzorging gegeven. Per ziektemodel is (of wordt) er een interne scorelijst/beslisboom opgesteld in samenspraak met de IvD en waar nodig ondersteund door experts die bekend zijn met het model.

Aangezien de farmacokinetiek van kandidaatstoffen mede bepaald wordt door het functioneren van de bloed-hersenbarrière en door of de stof al dan niet door drug-transporter eiwitten uit de hersenen getransporteerd wordt, kan het meest verfijnde model zijn om de farmacokinetiek (ook) te meten in (verder gezonde) dieren waarin deze transporteiwitten genetisch uitgeschakeld zijn.

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

Pijn, lijden en angst worden bij de dieren geminimaliseerd door:

- 1) Passende huisvesting met kooiverrijking. Wanneer groepshuisvesting niet mogelijk is door de aanwezigheid van externe delen van implantaten die kunnen worden aangevreten, maken we gebruik van sociale individuele huisvestingskooien. Deze kooien hebben een geperforeerde perspex scheidingswand die alle interacties behalve fysieke mogelijk maakt voor de dieren. Oppervlakte per dier voldoet aan de Europese richtlijn.
- 2) Gebruik van passende anesthesie en analgesie tijdens invasieve ingrepen.
- 3) Na de operatie worden alle dieren minimaal eenmaal per dag (tweemaal op werkdagen) gemonitord voor wondgenezing, algemeen herstel na operatie, gewicht van het dier, algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief (pijn, lijden of angst). Bijzonderheden worden vastgelegd in het welzijnsdagboek.

- 4) Monitoring van gewicht van het dier en andere algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief in de periode vanaf toediening tot het einde van de monsterverzameling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de bovengenoemde beslisboom (SOP Animal discomfort and humane endpoints).

In het geval dat een dier onverwachte tekenen van ongerief vertoont die duiden op bijvoorbeeld pijn, lijden of angst, zullen de symptomen door het biotechnisch team en een artikel 9 onderzoeker beoordeeld worden. Indien nodig wordt ook advies van een dierenarts ingewonnen. Dit kan leiden tot het termineren van het betreffende dier op grond van humane eindpunten en eventueel tot stopzetting van de studie.

Pijn, lijden en angst specifiek voor de te gebruiken ziektemodellen worden gemonitord volgens scorelijsten en beslisbomen die vooraf voor elk model opgesteld worden en met de IvD afgestemd. De experimenten aan deze ziektemodellen worden (voor zover de onderzoeksvraag dat toelaat) zoveel mogelijk voordat ernstige fenotypen optreden uitgevoerd.

Milieueffecten: n.v.t.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Aangezien het gaat om nieuwe potentiële geneesmiddelen is de kans op herhaling zeer klein, navraag bij de klant over eerdere *in vivo* experimenten met de kandidaatstof moet deze kans verder uitsluiten (study information data sheet). Wanneer gebruik wordt gemaakt van een referentiestof (bijv. gold standard of bekende (ant)agonist van een receptor om het werkingsmechanisme van de kandidaatstof te bepalen) kan het voorkomen dat een stof toegediend wordt die al eerder getest is in proefdieren, en waarvan de werking al bekend is. Herhaling is in dat geval noodzakelijk om het effect van de kandidaatstof te kunnen vergelijken met dat van een stof met een bekend effect. Waar mogelijk zal het aantal dieren in de referentiegroep minder zijn dan in de experimentele groepen.

Aangezien we als voorwaarde voor het uitvoeren van experimenten volgens deze bijlage (met ziektemodellen) stellen dat er voldoende kennis over PK en PD in wildtypedieren vergaard is (zie boven bij 2A), zullen in onder deze projectvergunning of elders dezelfde kandidaatstoffen al eens aan wildtypedieren toegediend zijn. Omdat het in deze bijlage de specifieke eigenschappen en effecten van/op PK en PD in het ziektemodel betreft, is dit geen herhaling.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten. Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de operatiewond, probe(s) en/of katheter en/of canule, en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de microdialyse moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de microdialyse op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken. Bij experimenten waar de microdialyse niet op de eerste of tweede dag na de operatie plaatsvindt (bijv. met (sub)chronische doseringen) worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een

tussenwand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact. In ieder geval worden kooien met individueel gehuisveste dieren zodanig geplaatst dat de dieren elkaar kunnen horen, zien en ruiken.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De operatie voor het inbrengen van de microdialyseprobe(s) en eventueel katheter en/of canule, die onder diepe algehele anesthesie plaatsvindt, is invasief en bij ontwaken na de operatie kunnen dieren hiervan ongerief ervaren, net als door het ontwaken uit de anesthesie zelf. Vooral het verwijderen van de periost en de incisie van de (hoofd)huid veroorzaken pijn bij de dieren. Pijnbestrijding vindt plaats door toediening van een systemisch analgeticum voor aanvang van de operatieve ingreep en topicale anestheticum op de plaats van de operatieve ingreep.

Indien van toepassing wordt optimale pijnbestrijding na de operatie gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Bij langer durende operaties kunnen de dieren waar nodig worden behandeld met een aanvullende dosis analgeticum. Bij nieuwe operatietechnieken / -gebieden zal voor het einde van de lichtfase op de dag van de operatie ook een tweede dosis analgeticum gegeven worden. Op basis van observaties wordt bij de standaard microdialyseprobe-implantaties extra pijnstilling alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geeft, op basis van de interne SOP.

Voor de beschreven ziektemodellen is het niet gebruikelijk om extra pijnstilling te gebruiken. Bij ernstig ongerief (wat zoals in Tabel 1 en bij K. beschreven wordt bij bepaalde combinaties van diermodellen en experimentele opzet kan optreden) is bij overschrijding van de vooraf bepaalde criteria voor de symptomen de toepassing van een humaan eindpunt geïndiceerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren, de uitgevoerde operatie kan ook een rol spelen.
2. Tijdens de experimenten zelf worden de dieren individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij elkaars implantaten of chirurgische wonden beschadigen bij sociale interacties. Individuele huisvesting is een bekende vorm van verminderd dierenwelzijn en moet zo beperkt mogelijk worden ingezet.

3. De andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te testen kandidaatstoffen, deze kunnen ondanks eerdere (veelal in vitro) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
4. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere dieren).

Daarbij kunnen de (zieke) dieren last hebben van modelspecifieke symptomen. Symptomen en het ingeschatte ongerief zijn daarbij analoog aan die bij patiënten met dezelfde ziekte. Daar het hier ziekten van het centraal zenuwstelsel betreft zijn de symptomen vaak verbonden met veranderde cognitie, emotie, locomotie, slaapregulatie en voedselinname. Voor een inschatting per ziektemodel en leeftijd, zie Tabel 1.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Om de farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van een potentieel geneesmiddel in humane patiënten te voorspellen is een diemodel met dezelfde fysiologie het beste model. De dieren uit deze ziektemodellen hebben vaak soortgelijke symptomen als de humane patiënten.

De oorzaken van het algemene ongerief dat door de experimentele opzet bij alle dieren kan ontstaan:

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Het knagen aan implantaten en onderling vechten hebben te maken met normaal sociaal gedrag van de dieren, dit is moeilijk anders tegen te gaan dan door individuele huisvesting.
3. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden. Indien een stof in onze studies ernstige bijwerkingen vertoont, wordt deze uiteraard niet toegelaten tot verdere testen.
4. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.

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

Om het ongerief door de modelspecifieke symptomen te minimaliseren worden waar mogelijk de experimenten op een zo vroeg mogelijk tijdstip in de ontwikkeling van de ziekte uitgevoerd. Vooral bij de neurodegeneratieve ziektemodellen is dit relevant. Daarbij is het vaak wel noodzakelijk om in deze studies daadwerkelijk in dieren met symptomen te testen. Als de dieren (nog) geen afwijkende fysiologie (bijv. bloed-hersenbarrière) ten opzichte van gezonde dieren vertonen, is de meerwaarde van het ziektemodel beperkt. Daarom wordt voor iedere studie en elke kandidaatstof zorgvuldig afgewogen (onderzoeker met klant en IvD) in welk stadium van de ziekte de studie plaats moet vinden en duidelijk afgesproken wat de humane eindpunten zijn. Daarbij is ook van belang of de door de klant ontwikkelde kandidaatstof voor een bepaald stadium van de ziekte ontwikkeld is, bijvoorbeeld of die een profylactisch of therapeutisch effect heeft.

Vanaf aankomst van de transgene dieren dan wel de inductie van het ziektemodel worden de dieren dagelijks gemonitord op modelspecifieke tekenen van ongerief. Bij het optreden van modelspecifieke symptomen treedt de interne beslisboom in werking en wordt de vooraf vastgelegde extra verzorging toegepast.

De maatregelen tegen het algemene ongerief dat door de experimentele opzet bij alle dieren kan ontstaan:

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de operatie een pijnstiller toegediend. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om in hun experimentele kooi te worden geplaatst.
2. Dieren in (sub)chronische experimenten worden gehuisvest in een speciaal ontworpen sociale "individual-group-housing-cage". Deze huisvesting behoudt olfactorische, auditieve en visuele interacties aangaan, maar beperkt fysiek contact. Daarnaast wordt altijd kooiverrijking aangeboden aan de dieren.
3. Negatieve effecten veroorzaakt door de kandidaatstof worden op vier manieren geminimaliseerd:

- a) Voorafgaand aan het opzetten van het experimentele ontwerp wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de kandidaatstof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren. Dit wordt verwerkt in de SIDS (study information data sheet)
- b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van de interne beslisboom (SOP Animal discomfort and humane endpoints). Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.
- c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.
- d) Door een goed experimenteel ontwerp kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening).
4. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.
- 5.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Na de operatie en tijdens het experiment wordt een humaan eindpunt toegepast bij:

- het loskomen van probes, katheter of canule (tevens wetenschappelijk eindpunt);
- meerdere convulsies;
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%);

Bij algehele slechte conditie van het dier na operatie: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht (zeer dof en ruw), veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur (met de hand voelbaar verhoogd of laag)), zonder de bovengenoemde indicaties voor een humaan eindpunt, kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

- **Mdr1a/b-Bcrp KO muis:** voor deze dieren gelden de algemene humane eindpunten zoals zojuist beschreven.

Voor de verschillende ziektemodellen zijn additioneel aangepaste eindpunten vastgelegd in zowel de algemene SOP "animal discomfort and humane endpoints" als in modelspecifieke werkinstructies. Het is voor onze studies van belang dat de symptomen niet zo ernstig zijn dat de hele fysiologie van het dier aangetast is. Experimenten worden daarom zoveel mogelijk vroeg in het ziekteproces uitgevoerd en afgesloten. Voor de verschillende ziektemodellen hebben we de volgende humane eindpunten vastgelegd. Als de specifieke studie vroegere effecten van het ziektemodel onderzoekt, kan het wetenschappelijke eindpunt ook al eerder liggen.

- **5xFAD Tg muis:**

- Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
- Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
- Bij een combinatie van gewichtsverlies minder dan 15% met matige problemen in de motoriek kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

- **Tg(tauP301L)4510 muis:**

- Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, bovenste luchtweg dysfunctie.
- **Q175 KI muis:**
 - Complete immobiliteit of het ontbreken van de omdraaireflex bij het plaatsnemen van het dier op de rug, of
 - Bij de combinatie van 2 van de volgende symptomen: ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek, onafgebroken stereotype gedragingen, steeds herhalende convulsies, gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, stereotype gedragingen met tussenpozen, een enkele korte convulsie, dysmetrie, chorea, dyskinesie van de ledematen, grijpkrachtverlies.
- **R6/2 muis:**
 - Complete immobiliteit of het ontbreken van de omdraaireflex bij het plaatsnemen van het dier op de rug, of
 - Bij de combinatie van 2 van de volgende symptomen: ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek, onafgebroken stereotype gedragingen, steeds herhalende convulsies, gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie, of
 - Leeftijd van 13 weken.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, stereotype gedragingen met tussenpozen, een enkele korte convulsie, dysmetrie, chorea, dyskinesie van de ledematen, grijpkrachtverlies.
- **mThy1-hSNCA, line 15 muis:**
 - Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van gewichtsverlies minder dan 15% met matige problemen in de motoriek kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.
- **Parkin KO rat:**
 - Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van gewichtsverlies minder dan 15% met matige problemen in de motoriek kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.
- **Rat of muis met 6-OHDA-laesie:**
 - Ernstige /zeer zware beperkingen in de motoriek* tot complete immobiliteit, of
 - Extreem draaigedrag rond de gehele lichaamsas, of
 - Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.
 - Bij een combinatie van verschillende van de volgende symptomen kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast: gewichtsverlies minder dan 15%, matige problemen in de motoriek, loopstoornis, hunching, prolaps van de penis, intrekken van de flanken.
- **EAE-model in rat en muis:**

- Hooke score 4: complete verlamming van de achterpoten met gedeeltelijke verlamming van de voorpoten, of
- Gewichtsverlies van meer dan 15%, of 20% vlak na de operatie.

* Alleen indien het experimentele protocol een specifiek symptoom beschrijft als verwacht voor het model en de experimentele procedure, kan met specifieke toestemming van de IvD een experiment uitgevoerd worden met een dier met dit symptoom.

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

5-10%

K. Classificatie van ongerief

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

De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongerief classificatie:

Intrinsiek ongerief door het ziektemodel geen tot ernstig*: geen ongerief 5-10%, licht ongerief 25-30%, matig ongerief 50-60%, ernstig ongerief 10-15%, zie bij 2.B. en Tabel 1 voor de verschillende modellen afzonderlijk.

* Dit zijn de getallen als we van een gelijkmatige verdeling van alle modellen, leeftijden, en stadia uitgaan. In de praktijk verwachten we dat het ongerief lager uit zal vallen omdat we hier uitgaan van het maximum.

Onder narcose brengen (licht)

Inbrengen van de probe(s) of guide-canule(s) en evt. katheter en/of canule (licht)

Bijkomen uit algehele narcose (matig)

Postoperatieve pijn en ongemak (matig)

Postoperatieve individuele huisvesting (licht bij acute experimenten, ook licht bij langetermijnexperimenten door speciale kooien met een geperforeerde tussenwand)

Het eventueel inzetten/vervangen van probes, onderhoud en testen van CSF-canule of katheter (licht)

Aansluiten van het dier aan de microperfusiepomp en evt. het bloedmonsterafnamesysteem (licht)

Toedienen van de experimentele stof (licht)

Toedienen van een barbituraat bij termineren (licht)

Cumulatief is het ongerief in deze experimenten als matig tot ernstig in te schatten*:

Matig: 80%

Ernstig: 20%

* Dit zijn de getallen als we van een gelijkmatige verdeling van alle modellen, leeftijden, en stadia uitgaan. In de praktijk verwachten we dat het ongerief lager uit zal vallen omdat we hier uitgaan van het maximum.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Voor het verifiëren van de juiste plaatsing van de microdialyseprobe(s) is het noodzakelijk om na afloop van de microdialyse de hersenen uit de dieren te halen. Dit is niet verenigbaar met het in leven houden van de dieren na afloop van de proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.
- Ja > Vul uw deelnemernummer in **5.1 lid2h**
- Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3
- Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1
- Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2 **5.1 lid2h** 02011187
- 1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie
- Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw
- E-mailadres contactpersoon
- Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing) Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw
- E-mailadres gemachtigde
- Vul de gegevens van het postadres in.
- Straat en huisnummer
- Postcode en plaats
- Postbus, postcode en plaats
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer

- 1.5 *(Indien van toepassing)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- E-mailadres
(Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
- 1.6 *(Indien van toepassing)* Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.
- E-mailadres
(Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
E-mailadres
- 1.7 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn
- Telefoonnummer
- 1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- E-mailadres
 Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
 Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Gaat uw aanvraag over een *wijziging* op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 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 *melding* op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6
- Gebruik van een niet in originele aanvraag beschreven muisstam: Mdr1a/b-Bcrp constitutieve knock-out. Dieren die homozygoot zijn voor alle 3 de knock-out-mutaties zijn gezond en ontwikkelen zich normaal. Ingangsdatum 11 januari 2021.

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum - -
Einddatum (t/m) - -
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?
- Naam DEC
Postadres
E-mailadres

4 Factuurgegevens

- 4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.
- Naam: _____ Afdeling: _____
 Straat: _____ Huisnummer: _____
 Postcode: _____ Plaats: _____
 Postbus: _____ Postcode: _____ Plaats: _____
 E-mail: _____
- 4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.
- Ordernummer: _____

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

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

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

Handtekening

5.1 lid2e

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 24 februari 2021 12:35
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: Ontvangstbevestiging Melding projectvergunning dierproeven A 5.1 lid2h 02011187-1

Geachte 5.1 lid2e,

Wij hebben op 23-02-2021 een melding ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Farmacokinetische en farmacodynamische bepalingen met behulp van microdialyse voor de ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten van het centraal zenuwstelsel." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202011187, waarvoor op 29-12-2020 een vergunning is afgegeven. Uw melding is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 02011187-1.

U geeft aan dat zowel het ongerief voor de dieren als het aantal dieren niet toeneemt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl