

Inventaris Wob-verzoek W22-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS202114906	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 vergunningsaanvraag				x		x		x	
2	Aanvraag projectvergunning, d.d. 4 mei 2021				x		x		x	
3	projectvoorstel (1)				x				x	
4	bijlage dierproeven (1)				x				x	
5	NTS (1)			x						
6	DEC-advies, d.d. 29 juni 2021				x				x	
7	projectvoorstel (2)				x				x	
8	bijlage dierproeven (2)				x				x	
9	NTS (2)	x								
10	conceptadviesnota aan CCD met opmerkingen, d.d. 2 juli 2021				x		x		x	x
11	adviesnota aan CCD, d.d. 2 juli 2021				x		x		x	x
12	e-mail met vragen aan VGH, d.d. 6 juli 2021				x		x		x	
13	antwoorden van VGH (in blauw) op vragen van CCD, d.d. 7 juli 2021				x		x		x	
14	bijlage dierproeven (3)				x				x	
15	e-mail met vragen aan VGH (2), d.d. 12 juli 2021				x		x		x	
16	antwoorden van VGH (in blauw) op vragen van CCD (2)				x				x	
17	concept aanvullende adviesnota aan CCD, d.d. 19 juli 2021				x				x	x
18	aanvullende adviesnota aan CCD, d.d. 19 juli 2021				x				x	x
19	beschikking, d.d. 3 augustus 2021				x		x		x	
20	terugkoppeling aan DEC, d.d. 12 augustus 2021				x		x		x	
21	begeleidend schrijven bij terugkoppeling 2021 (voorwaarde), d.d. 31 maart 2022				x		x		x	
22	terugkoppeling 2021				x				x	
23	e-mailreeks terugkoppeling 2021 aanvullende vraag, d.d. 7 april - 2 mei 2022				x		x		x	
24	terugkoppeling 2021 aangevuld				x				x	
25	goedkeuring terugkoppeling, d.d. 13 juni 2021				x		x		x	

5.1 lid2h

1

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Via de ftp-server heb ik twee CCD aanvragen ingediend; *Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions* en *Het aanleren en onderhouden van biotechnische vaardigheden en het ontwikkelen van nieuwe biotechnische methodes*.

Ik heb begrepen dat de DEC-projectaanvragen ook in een ad hoc aangemaakte Teams-afspraak behandelen buiten het reguliere vergaderrooster om. Is het mogelijk de twee huidige aanvragen gelijktijdig in een ad hoc meeting te behandelen en te bespreken?

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
- 1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie **5.1 lid2h**
- Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder
- | | | | |
|-------|-------------|------------|--|
| Titel | Voorletters | Achternaam | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw |
|-------|-------------|------------|--|
- 5.1 lid2e**
- E-mailadres contactpersoon **5.1 lid2e**
- 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 **5.1 lid2h**
- Postcode en plaats **5.1 lid2h**
- Postbus, postcode en plaats **5.1 lid2h**
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters **5.1 lid2e** Dhr. Mw.
- Functie **5.1 lid2e**
- Afdeling **5.1 lid2h**
- Telefoonnummer **5.1 lid2h**

- 1.5 *(Indien van toepassing)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- E-mailadres **5.1 lid2e**
- (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 Dhr. Mw.
- (Titel) Naam en voorletters
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- 1.7 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn
- Telefoonnummer **5.1 lid2h**
- E-mailadres **5.1 lid2h**
- 1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 11 - 06 - 2021
- Einddatum (t/m) 10 - 06 - 2026
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?
- Naam DEC **5.1 lid2h**
- 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 1
- 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 **5.1 lid2e**
 Plaats **5.1 lid2h**
 Datum **04-05-2021**
 Handtekening **5.1 lid2e**



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Motivation

The motivation for this research lies in the development of new treatments that can be used to cure or

alleviate symptoms in patients suffering from conditions of the nervous system. Many neurological and psychiatric conditions including but not limited to Alzheimer's, Parkinson's & Huntington's disease, schizophrenia, multiple sclerosis, chronic pain, epilepsy and rare congenital conditions currently cannot or can only insufficiently be treated. It is at the moment still impossible to cure neurodegenerative conditions retreating only to lighten symptoms or slow-down disease progression. These conditions create enormous suffering for the patients and their surrounding as they progress to a fatal end.

Background

5.1 lid2h, among other activities, conducts 5.1 lid2h to help pharmaceutical companies and academic institutions gain detailed insight into the possibilities of their experimental substances to potentially serve as new treatments against these conditions. With a plethora of techniques and methods, we are able to test drug candidates for their mechanism of action, efficacy and bioavailability. The *ex vivo* electrophysiological approach eliminates discomfort from the animals that would otherwise be present if electrophysiological recordings would be performed *in vivo*. *Ex vivo* electrophysiological evaluation of neuronal activity in cells that are exposed to different pharmacological conditions can help to advance the understanding of neurological conditions and identify pharmaceutical approaches that may lead to new treatments. This can be achieved by providing focused expertise and by utilizing state-of-the-art techniques to evaluate these test substances faster and thus with lower financial burden to the society.

Context

The project outlined here relates to a continuation of an existing project within our organization. Over the past five years, under project approval AVD 5.1 lid2h 016534 (previously 5.1 lid2h 016534), potential new treatments targeting conditions of the nervous system have been evaluated for our sponsors. In the first 4 years of the approval (2016-2020) about 20 studies were conducted that helped our sponsors to understand the effect(s) of their experimental compounds and to make informed decisions about progressing them to further drug development stages.

3.2 Purpose

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

- If applicable, describe all subobjectives

The purpose of this project is the acquisition of translational knowledge about the electrophysiological effects of potential new treatments in relevant regions of the nervous system or other electrically active tissue. Purpose is the study of the efficacy of substances to engage with their target (e.g. receptor or ion channel) and the associated effects on the electrical activity of the cells. Examples of this activity are the cell's capability to fire action potentials (excitability), the synaptic connectivity and modulation of synaptic strength (learning and memory), as well as currents of distinct ion channel types that are targets of pharmacological modulation. Moreover, possible side-effects on the electrophysiological function of individual cells or groups of cells can be assessed (e.g. epileptiform activity or undesired effects on certain ion channels) and characterized as an early indication of the safety profile that would then have to be further evaluated in regulatory safety studies. The acquired information is essential to ensure good translation towards *in vivo* animal models and ultimately towards clinical evaluation. Finally, the information may also become part of documentation associated with IND-filing (IND = Investigational New Drug) to obtain approval for first-in-human study.

Immediate goals

The immediate goal of the studies is the postmortem collection of tissue. The tissue will be used to obtain tissue slices or primary cells for direct use or culture with viable cells/neurons. From these cells, measurements of one or several relevant electrophysiological parameters are performed. Advanced methods to record minute electrical signals *ex vivo* are utilized in conjunction with application of potential new treatments or controls (e.g. specific (ant-)agonists or modulators of ion channels). The complex

electrical signals are analyzed with refined methods and meaningful information are extracted for conclusive evaluation of potential new treatment and compounds. Electrophysiological recording performed from such preparations have the advantage over i.e. differentiated stem cells that the synaptic connectome is preserved (tissue slices) and that the ion channel expression closer matches the *in vivo* situation.

Ultimate goals

The ultimate goals are to gain a deeper understanding of the functional underpinnings of neuronal conditions and to acquire information about the mechanism by which drug candidates could serve as new treatments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust due to genetic conservation (Jegla et al., 2009).

Given that the sponsors request our services and expertise at different development stages of their potential new treatment, detailed immediate and ultimate goals may differ per sponsor and compound. The research question that we are requested to address by the sponsors depends on the existing knowledge about properties of the compound, on the in-house expertise and laboratory options of the sponsor and on which aspects they intend to outsource to us or other 5.1 lid2h. Together with the sponsor, the researcher designs studies to best answer their research question in the light of the research expertise and capabilities at our site and at other sites within 5.1 lid2h.

Examples of such research questions are:

- Does a potential new treatment change a particular electrophysiological parameter (e.g. ion channel current)?
- What is the dose-response relationship of a potential new treatment on a particular electrophysiological parameter (indicative of a future therapeutic range *in vivo*)?
- Is the effect of a potential new treatment specific to a certain target (e.g. ion channel)?
- Can a pharmacologically evoked *ex vivo* disease phenotype (such as pharmacologically induced epileptic seizures in hippocampal slices (Steidl et al., 2019) be addressed by the experimental substance?
- Is the effect of the investigated new potential treatment superior to effect(s) of existing medications (also in context of side-effects)?
- Are there side-effects of a potential new treatment on electrophysiological parameters?

We aim to continuously develop and optimize the established methods in the light of the latest scientific and methodological progress so as to increase quantity and quality of obtained data and to contribute to increase the success rates in drug development efforts.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The license holder is a Dutch subsidiary of 5.1 lid2h with a broad set of expertise in development of new treatments within the Netherlands and worldwide. Our sponsors are globally located pharmaceutical and biotechnology companies as well as academic institutions. The facilities at our site are AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) accredited.

Our researchers have broad experience in various aspects of drug development and are able to provide proficient advice on the planning of the experiments and the interpretation of the results. Feasibility of the described experiments is ensured by our highly skilled and experienced personnel congregating many years of applying these techniques within our company location. The lead scientist has more than 13 years of experience with the techniques in academic and industrial settings. The biotechnicians are authorized and competent to carry out animal the related actions.

From the methodological perspective, we rely on established techniques that have been successfully used and expanded at our site for the last years covered under the previous project license (AVD5.1 lid2h 2016534).

Individual studies are designed and executed to provide answers to each sponsor's specific research question and typically have durations of several weeks from experimental work to data analysis and

reporting. Thus, it is feasible to conduct multiple studies within the 5-year span of the project request.

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 and describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

To be able to execute these studies, it is important that the facility not only complies with the *Wet op de dierproeven* but also with adjacent laws and regulations such as the *Opiumwet*. The related appropriate permits are in place, and therefore these law and regulations will not negatively affect welfare of the animals or the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

According to the WHO, many millions of people worldwide are affected by a neurological condition – with far-reaching social and economic consequences. In the light of the demographic change it is expected that these numbers and the associated burden will further increase over the next decennia. Despite the fact that several hundreds of potential new treatments are under development at any given time, for years, only about 10-15 new treatments are approved per year (Medicines in Development for Neurological Disorders 2013, 2018).

Many drug candidates fail in late stages of development, often even as late as during clinical phases. This is a situation that leads to enormous delays and exorbitant development costs in order to obtain effective and safe treatments – eventually keeping patients' needs unmet.

It is therefore of utmost importance to characterize new neurological treatments for their potential in early stages of the (pre-clinical) development by reliable translational methods. The methods described in this application are particularly well suited to understand the functional underpinnings of neurological conditions as well as to evaluate drug candidates for their potential to serve as remedies for these conditions. The *ex vivo* approach allows for direct observation and measurement of cells in a preparation that preserves most physiological properties of the cellular function as in the intact animal, while it allows for defined pharmacological conditions and for multiple measurements from the derived tissue and effectively reduces the number of animals used. Moreover, it allows for increased throughput in evaluating (screening) compounds for their potential to be advanced further into clinical evaluation.

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

The experiments are conducted for our **sponsors** and will provide data to help them to make decisions on advancing potential new treatments for further (pre-)clinical development on the basis of the substance's effect on cellular electrical activity and information processing.

The information derived from these experiments is used to identify suitable candidate substances that have the potential to serve as treatment in the future. It is therefore required to understand their effectiveness (and effective dose) on the cellular target (e.g. receptor or ion channel) and the consequences on electrical signaling. *Ex vivo* assessment of cells contributes to the reduction of the use of **animals** as it forms an important and decisive pre-requisite before shift of focus on further *in vivo* experiments; first by eliminating non-effective substances from the development pipeline and second by guidance towards a meaningful dosing range.

In the clinical phase it is an ethical obligation to protect the **study participants** against avoidable harm or suffering. Therefore, medical ethical boards require solid data from pre-clinical research before granting clinical trials with an experimental substance. Mechanistic data on a substance's function at the cellular level is indicative of the possible range of undesired (side-)effects and the research described in this project proposal contributes to deepen understanding in this domain.

Our studies contribute to our sponsors' aim to provide their potential new treatments to patients. Ultimate stakeholders are therefore the **patients**, their families and their social sphere.

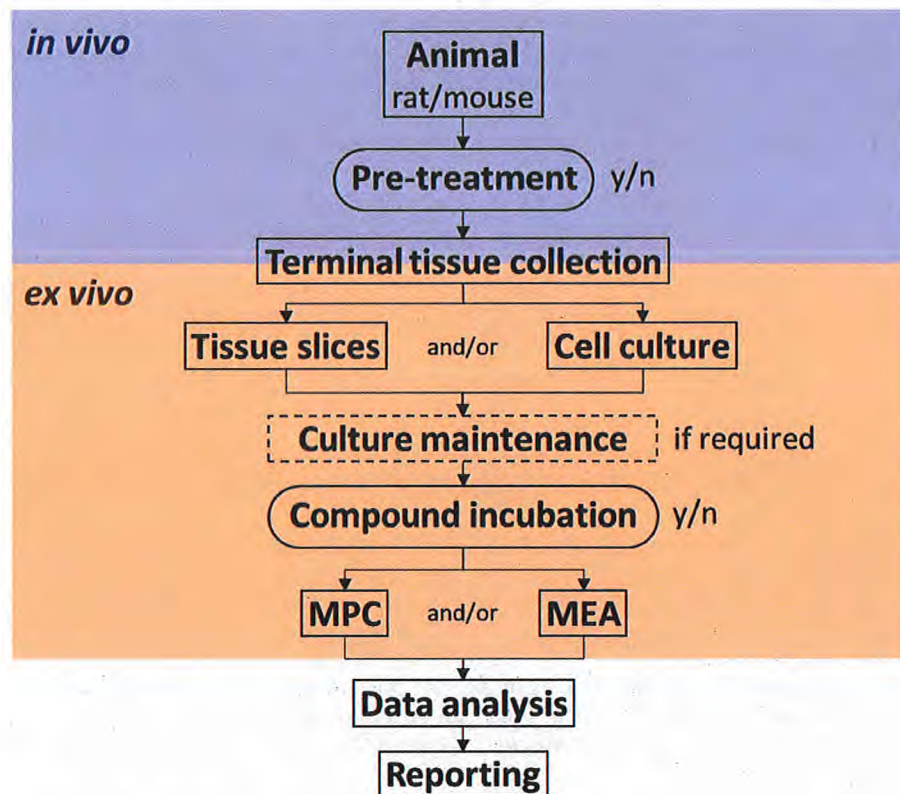
3.4 Strategy

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.

We enable our sponsors to gain insight into the mechanism of action of their drug candidates by tailored electrophysiological examination of compound effect on tissue/cells from animals (rat/mouse).

As visualized in the diagram below, experiments will consist of the following steps:

- 1) Arrival of animals and (group) housing in holding room
- 2) Optional acute or chronic (pre-)treatment with potential new treatments / compounds
- 3) Termination of individual animals under anesthesia
- 4) Post-mortem tissue collection
- 5) Processing of tissue to obtain multiple tissue slices or primary cell culture from the relevant brain region
- 6) *Ex vivo* electrophysiological assessment by manual patch-clamp (MPC) and/or multi-electrode array (MEA) under defined pharmacological conditions (reference compound and/or test compound / potential new treatment)
- 7) Data analysis and reporting of results



3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The herein described animal experiments have in common that tissue collected from animals is used for research on (neurological) conditions and for the development of new treatments. The applied techniques are broadly applicable as the measurements directly or indirectly address the receptors and ion channels present in the membrane of cells. These vary across different cell types and tissues but can be studied with the same techniques. The techniques can be used to study electrophysiological differences on a fundamental level.

The differences can be:

- between (naïve) cells
- between cells of different brain regions
- in the presence or absence of experimental compounds and/or reference compounds

The strategy described above rests on the technical advantage of the herein applied methods to keep cells viable outside of the donor animal. As an advantage over *in vivo* methods, the *ex vivo* approach allows for better access to the cells and for sensitive measurements while the environmental factors (composition of solutions in which the tissue slices/cells are kept in) can be fully controlled. In contrast to *in vivo* preparations, the *ex vivo* setting allows for rapid wash-in and wash-out of test compounds as well as of reference compounds. These reference compounds typically are well characterized selective agonists or antagonists to a certain target (e.g. ion channel) and enable us to pharmacologically dissect the effect and unravel the mechanism of action of the investigated experimental substance. While the approach is reductionist, it allows for answering questions on the mechanism(s) underlying a certain condition as well as on the effects of substances on the electrophysiological parameters of cells and their potential to be used as new treatment.

For the individual studies, together with the sponsor, a study design is determined that is best suited to answer the (specific) research question. Factors like the selection of the most informative electrophysiological parameter, optimal use of collected tissue and measurements from multiple cells are taken into consideration in order to (1) minimize the number of animals required, (2) reduce the discomfort in case *in vivo* (pre-) treatment is used.

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	Tissue collection from mice and rats for <i>ex vivo</i> electrophysiological measurements
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information 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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Tissue collection from mice and rats for <i>ex vivo</i> electrophysiological measurements

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Experimental approach

The animal experiments are performed in order to collect postmortem tissue for *ex vivo* electrophysiological measurements. In some cases, animals will be subject to pre-treatment with experimental compounds / potential new treatments.

Neurological conditions like neurodegenerative or neuropsychiatric conditions, or (chronic) pain are accompanied by changes in electrical signaling among (neuronal) cells. *Ex vivo* electrophysiology provides an outstanding possibility to study the physiological mechanisms (e.g. by infusion of selective (ant-)agonists or modulators of ion channels) and the effect of potential new treatments on the level of individual cells as well as their local network. The techniques allow for the measurement of minute electrical signals associated with neuronal/cellular information processing and electroactive function.

Ex vivo electrophysiology techniques used at our research facility are manual patch-clamp (MPC) and multi-electrode arrays (MEA).

MPC: This technique builds on direct physical contact of a glass capillary electrode with the subject cell either in tissue slices or cell culture. It is considered the gold-standard for the most comprehensive understanding of the electrical state of a cell – and allows for measurements ranging from action potential and synaptic activity to individual ion channel currents.

MEA: This technique makes use of arrays of metal electrodes that pick up extracellular signal of neuronal activity. It is particularly suited for the examination of populations of neurons for their spontaneous activity, for mechanisms of synaptic plasticity (associated with learning and memory, processes impaired in many neurodegenerative conditions e.g. Alzheimer's disease) and for synchrony of electrical activity (e.g. epilepsy).

Primary outcome parameters

Primary outcome parameter of the animal study is the obtained tissue which will then be used to generate tissue slices or primary cell culture.

Secondary outcome parameters

Secondary outcome parameters are associated with measurements of the electrophysiological state of the neurons/cells (within tissue slices or from tissue based primary cell culture) and include but are not restricted to:

- 1) General electrophysiological properties (i.e. resting membrane potential, membrane resistance, and membrane capacitance)
- 2) Properties of spontaneous or stimulated action potentials (i.e. frequency and amplitude)
- 3) Properties of spontaneous or stimulated synaptic potentials and currents (i.e. frequency and amplitude)
- 4) Transmembrane currents originating from ion channels (identified by distinct activation protocols and specific pharmacological isolation)
- 5) Population (synaptic) activity of groups of neurons (e.g. associated with learning and memory, or epilepsy)

The set of parameters assessed in a particular study is determined by the research question and the proposed mechanism by which the experimental compounds are expected to act on the cells. These parameters are standard parameters for the MPC or the MEA techniques.

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

Animals are received at the vivarium and kept in open or individually ventilated (IVC) cages (according to directive EU 2010/63).

Depending on the experimental design it may be required to treat the animals before termination (under general anesthesia). Individual animals may be dosed once or several times (maximum 60 times in total, e.g. 2 months daily, or 1 month twice daily) with test compound(s) (experimental and/or reference compound or vehicle).

Possible routes of administration are among others:

- subcutaneous
- intraperitoneal
- oral (per gavage or as part of the diet)
- rectal
- intranasal
- intravenous
- intramuscular

To determine concentrations of test compound, blood samples may be collected terminally or during (chronic) dosing (via cheek-vein puncture for mice or tail-vein puncture for rats). In the case that blood samples are collected during the *in vivo* phase, this will be up to a maximum of 10% of the blood volume taken within up to 1 week. After the animal is anesthetized and subsequently terminated according to annex IV of directive EU 2010/63, central nervous system (CNS), peripheral nervous system (PNS) or other electrically active tissue will be collected. The tissue will be extracted from the animal as fast as possible and processed further. Additionally, further tissue could be collected to, for example, determine the test compound levels.

Tissue processing for *ex vivo* electrophysiology can be:

- Generation of tissue slices utilizing a precision cutting apparatus (i.e. a vibratome)

- Isolation of individual cells, creating a primary culture, by means of chemical and mechanical dissociation

Electrophysiology may be performed directly after tissue processing or after further culturing for prolonged time in suitable conditions.

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

The number of required animals for a given study is primarily determined by the expected number of successful measurements per collected tissue from one animal, and by the number of measurements required for statistical robustness. To determine the required number of measurements/animals - statistical power-analysis is used (online available software G*Power: <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>)

The expected number of successful measurements per collected tissue depends on:

- whether the study question can be best answered by using tissue slices or primary cell culture
- the time required for the individual measurements in context of *ex vivo* survival of the tissue slices or primary cells.
- the number of relevant tissue slices or cells that can be obtained from one animal

The number of required measurement repetitions primarily depends on the expected intrinsic variance of the electrophysiological parameters of the different cell/receptor (sub-)types. If an experimental compound is tested, the variance in response, number of different concentrations and relevant controls will also determine the number of required animals.

Typical group sizes are 5 animals. From each animal, it allows for the generation of several brain slices (i.e. 3-4 brain slices from hippocampus), or to obtain primary cells (i.e. $2-5 \cdot 10^5$ cells from dorsal root ganglia) which are seeded on multiple coverslips. Each individual slice or coverslip can be used for one or several measurements – thereby substantially reducing the number of required animals. If the experimental design allows, repeated measurements from the same cells are performed to increase statistical power (i.e. cells exposed to several subsequent pharmacological conditions including vehicle control). Furthermore, subsequent analysis of the data after each animal allows us to determine if sufficient data has been collected or if additional animals may be used.

B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mouse	1) animals bred for use in procedures	Early postnatal up to adult/aged	300	Male and female	No	
2	Rat			300			

Provide justifications for these choices

Species	Mice and rats will be used for the experiments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust. They are also the species most often used for other studies by the sponsor, therefore their use ensures the comparability to those other studies.
Origin	All animals will be sourced from certified breeders.
Life stages	Depending on the study requirements, young up to adult animals will be used for tissue collection. For primary cell culture, we would mostly use early postnatal animals.

Number	The numbers are considered the expected maximum to be used and may be less. Within the last 5 years studies on average consisted of 4 groups with 5 animals per group. We expect to perform a maximum of 15 studies on each species.
Gender	In most cases, males will be used to ensure the set up matches to other studies by the sponsor. However, males and females may be used if tissue is collected from postnatal animals and if gender is not a relevant factor for the research question. During the development of the study plan, the gender of the animals is considered with the sponsor and the scientific importance of using both genders for evaluation of effects of new potential medication is emphasized.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Predominantly C57Bl/6 mice and Sprague Dawley or Wistar rats will be used. Depending on the research question, sponsors may require us to use other standard strains.

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

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.

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

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

- 1) Before obtaining tissue post-mortem, animals may be acutely or (sub-)chronically administered experimental compound. Despite prior (*in vitro* and/or *in vivo*) testing, these compounds may cause unknown adverse effects.
- 2) If older animals are used, it is also important to consider age-specific compromises on welfare (for example (but not exclusive to) the formation of ulcers in older animals)

Explain why these effects may emerge.

- 1) The experimental compounds are often not fully characterized for their possible spectrum of adverse effects and may have not yet been (further) tested in animals. Therefore, it may be possible that unexpected adverse effects may emerge that may be observed for the first time. If a compound would show adverse effects exceeding moderate discomfort, relieving treatment is considered or animals will be euthanized as soon as possible.
- 2) If older animals are used, specific discomfort is mostly associated with aging as it would be experienced by elderly humans.

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

- 1) Negative effects associated with the experimental compound will be minimized as follows:
- In the context of designing the experiments, detailed information about the experimental compound will be requested from the sponsor. This information may predict potential emergence of discomfort.
 - After administration of experimental compound, animals will be monitored for signs of discomfort and adverse effect. Animal welfare will be evaluated utilizing an internal decision-tree. If required and reasonable, special care will be provided.
 - If effects emerge that were not foreseeable and/or not described in the decision-tree, in conjunction with the IvD and the veterinarian, measures will be evaluated to relieve the discomfort or, if required, to terminate the animals.
 - In most cases, one animal or a small group of animals will be subjected to tissue collection for the electrophysiology procedures. Therefore, emergence of adverse effects will likely show in first animal(s) taken into experiment. Hereby we can ensure that experimental compound related adverse effects can be addressed early and appropriate measures be taken.
- 2) The relevance/necessity of using older animals will be discussed in detail with the sponsor. Close monitoring of the animals will ensure that emergence of discomfort can be recognized early and special care accounting for the specific requirements can be given.

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.

In cases where animals are pre-treated, circumstances requiring humane endpoint implementation may arise with low likelihood.

Criteria for humane endpoints are described in the internal SOP *Animal discomfort and humane endpoints* and include parameters such as weight (in general weight-loss of more than 15% in short time), fur condition, eye coloration, skin coloration, body temperature, mobility, and alertness).

Indicate the likely incidence.

Very low, <1%

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).

To obtain tissue for the electrophysiological measurements, animals are terminated under general anesthesia (i.e. isoflurane) without any previous procedures, the severity is therefore classified as mild (70% of animals). If animals are administered experimental compounds, with or without blood sampling before termination, the experiments are considered to cause mild (20% of animals) to moderate (10% of animals) discomfort depending on the frequency of the performed procedures. For the individual studies, the AWB will assess the cumulative discomfort of the animals based on all procedures performed on an animal.

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>In most cases, prior to the studies proposed here, experimental compounds have been evaluated in mitotic cell lines or (human) immortalized cell lines that express the relevant receptor(s)/ion channels(s) for a principle understanding of the interaction with their target receptor.</p> <p>However, use of these cell lines forms a highly reductionist approach and does not account for the complexity in connectivity and natural expression state. The methods described in this application allow for a functional understanding in viable neurons and form an important intermediate translational step between early mechanistic insights on the receptor level and <i>in vivo</i> evaluation of effect.</p> <p>Similarly, the study of natural synaptic connectivity from CNS slices currently cannot be substituted by using cell lines. Recent progress in (<i>in silico</i>) modelling of neuronal function may provide a useful initial step in drug development. However, as these models are built under assumptions derived from electrophysiological measurements under controlled conditions, they are naturally insufficient to reveal unknown aspects of mechanisms of action and functional implications of experimental compounds that only can be evaluated in viable neurons/cells.</p>
Reduction	<p>The herein described procedures allow for obtaining multiple CNS slices or primary cell culture from a single animal. Maintaining viability of the cells within the slice or in culture enables us to perform multiple measurements from the biological material derived from one animal. Moreover, in most cases it is possible to measure several electrophysiological characteristics (such as resting membrane potential, action potential firing and properties, synaptic connectivity) from one cell, thereby further reducing the required tissue and thus the number of animals.</p> <p>When collecting tissue for the electrophysiological experiments from non-treated animals it is also possible to harvest clean tissue(s) for reference material in bioanalytical studies. A separate license (AVD^{5.1.1321} 20184846) is in place for collection of this type of tissue but harvesting tissue from animals under this license reduces the number of animals required for the other license.</p>
Refinement	<p><i>Ex vivo</i> electrophysiological experiments in themselves are considered a refinement for the advantage that the measurements are performed in tissue / cell culture and the subject animals from which the tissue was obtained do not experience effects of the electrophysiological measurements. Nonetheless, mild to moderate discomfort may arise if animals are pre-treated with experimental compound. Refinement of procedures to alleviate this potential discomfort have been described above for addressing of possible adverse effects.</p> <p><i>Ex vivo</i> evaluation of experimental compound serves an important gate-keeper function in decision making for advancing compounds to <i>in vivo</i> testing, thereby reducing the risk of unnecessary <i>in vivo</i> tests of non-effective compounds.</p>

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.

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.

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.

Not applicable. No **legally required animal procedures.**

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.

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.

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

The outlined experiments require the collection of tissue from essential organs for electrophysiological measurements that cannot be obtained otherwise. Thus, the animals will be terminated under anesthesia.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Animals will be decapitated under (deep) anesthesia.

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

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

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-789276 v.1 5
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Elektrofysiologie Nieuwe behandelingen Neurologische aandoeningen Rat Muis
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Het doel van dit project is om bij te dragen bij de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor ziekten aan het centrale zenuwstelsel.</p> <p>De zenuwen in het zenuwstelsel communiceren met elkaar door middel van elektrische signalen. In dit project wordt elektrofysiologie gebruikt, een techniek die deze signalen kan meten. Weefsels of cellen verkregen vanuit rat of muis worden buiten het dier in leven gehouden. Vervolgens kunnen de elektrische signalen gemeten worden en kunnen er nieuwe kandidaatmedicijnen aan de cellen worden toegevoegd, waarna potentiële effecten gemeten kunnen worden. Op basis van de uitkomsten van dit project kunnen nieuwe behandelingen verder ontwikkeld worden en hun werking beter begrepen worden.</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>Een kwart van de populatie krijgt te maken met neurologische ziekten, zoals Alzheimer, Parkinson, depressie of chronische pijn, een minstens even groot deel van de bevolking zal als mantelzorger betrokken zijn bij een patiënt met een neurologische aandoening. Voor veel van deze ziekten is nog geen, of geen goede, behandeling beschikbaar.</p> <p>In dit project wordt er bijgedragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelingen, door middel van de gespecialiseerde technieken (elektrofysiologie). Kennis verkregen met deze elektrofysiologische technieken zal ervoor zorgen dat veelbelovende nieuwe medicijnen verder ontwikkeld kunnen worden.</p>

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Dieren worden voornamelijk gebruikt voor het verkrijgen van weefsel en/of cellen. Hiervoor zullen de dieren onder narcose gedood worden, waarna het benodigde weefsel (bijvoorbeeld de hersenen) geïsoleerd wordt en vervolgens gebruikt wordt voor de ex vivo elektrofysiologische experimenten. In sommige gevallen zullen de dieren vooraf gedoseerd worden met een nieuw medicijn. Dit kan eenmalig zijn, maar ook vaker. In deze gevallen kunnen ook één of meerdere bloedmonsters afgenomen worden. De duur van iedere handeling is hooguit enkele minuten, bij herhaalde doseringen van een nieuw medicijn is de totale duur maximaal twee maanden.</p>																						
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Bij de meeste dieren is de enige handeling het onder narcose doden (om weefsel te kunnen isoleren). Naar verwachting bij eenderde van de dieren wordt er voorafgaand aan het isoleren van weefsel, een nieuw potentieel medicijn toegediend. Deze toediening zal eenmalig of meerdere keren zijn, afhankelijk van het te testen medicijn en de voorgenomen toepassing in de kliniek. Voor een toediening worden de dieren kort vastgehouden en meestal is de toediening met behulp van een injectienaald. Net als bij mensen veroorzaakt dit een kort prikje en kunnen de dieren dit kort onaangenaam vinden.</p>																						
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>300</td> <td>0</td> <td>270</td> <td>30</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</td> <td>300</td> <td>0</td> <td>270</td> <td>30</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	300	0	270	30	0	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	300	0	270	30	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad																			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig																		
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	300	0	270	30	0																		
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	300	0	270	30	0																		
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd															
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																						
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd																				
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden onder narcose gedood om het weefsel te verkrijgen.</p>																						

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Cellen in het zenuwstelsel zijn complex door de vele verbindingen die ze kunnen maken en de wijze waarop ze elektrische signalen afgeven, doorgeven of remmen. Deze complexiteit kan momenteel niet bestudeerd worden door middel van niet-biologische modellen.</p> <p>Computersmodellen voor deze specifieke cellen zijn zeer gelimiteerd naar specifieke functies. Voor een goede bepaling hoe elektrische signalen worden doorgegeven en hoe dit beïnvloed wordt door nieuwe medicijnen zijn levende cellen en/of weefsels nodig. Deze worden verkregen van dieren, waarbij ex vivo elektrofysiologie voor een deel in vivo elektrofysiologie kan vervangen.</p>
<p>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, computersmodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Bij ex vivo elektrofysiologie worden meerdere metingen verricht aan het weefsel dat uit één dier verkregen wordt. Het weefsel, bijvoorbeeld hersenen, wordt in dunne plakjes gesneden, waarna elk plakje gebruikt kan worden voor de elektrofysiologische experimenten.</p> <p>Cellen worden geïsoleerd en uitgezaaid op microscoopglasjes, ieder glasje kan gebruikt worden voor metingen .</p> <p>Daarbij worden er in de meeste gevallen meerdere elektrofysiologische aspecten bestudeerd binnen één experiment.</p>
<p>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.</p>	<p>Ex vivo elektrofysiologie wordt gezien als een verfijning ten opzichte van in vivo elektrofysiologie. Door alleen met het weefsel te werken, ondervindt het dier geen ongerief afgezien van het ongerief geassocieerd met eventuele toedieningen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Muizen en ratten worden gebruikt, de cellulaire systemen zijn vergelijkbaar met die van mensen. Voor het isoleren van cellen worden vaak pasgeboren dieren gebruikt, omdat de cellen van zulke jonge dieren beter buiten het dier blijven groeien. Voor het meten in weefsel, bijvoorbeeld hersenen, worden voornamelijk (jong-)volwassen dieren gebruikt, omdat de elektrische verbindingen tussen de cellen beter ontwikkeld zijn en meer overeenkomen met de menselijke fysiologie.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 2021 14906
2. Titel van het project: *Ex vivo* electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions
3. Titel van de NTS: *Ex vivo* elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 5.1 lid2h
 - telefoonnummer contactpersoon: 5.1 lid2h
 - e-mailadres contactpersoon: 5.1 lid2h
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 18-5-2021
 - aanvraag compleet: 18-5-2021
 - in vergadering besproken
 - anderszins behandeld: in online overleg 31-5-2021
 - termijnonderbreking(en) van 6-6-2021 tot 15-6-2021
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 15-6-2021
 - advies aan CCD: 29-06-2021
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
Ja, de aanvraag is afgestemd met de IvD en heeft instemming van de IvD.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc.) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 6-6-2021
 - Gestelde vraag/vragen: zie hieronder
 - Datum antwoord: 15-6-2021
 - Verstrekt(e) antwoord(en): zie hieronder
 - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
 - Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

Onze vragen

Projectbeschrijving

1. Bij 3.4: In de strategie die u beschrijft, mist de DEC een aantal elementen die voorafgaan aan de experimenten. Kunt u aangeven welke strategie er is om vanaf het moment van de klantvraag een aantal besluiten te nemen? Denk aan hoe u besluit:
 - om wel of niet op de klantvraag in te gaan
Decisions on whether a particular study request is accepted by us will depend on a feasibility evaluation. This evaluation is driven by the expertise of our personnel/experimenters and by our technical capabilities to answer the specific research question. Furthermore, it will be ensured that the study request is in agreement with the animal experiments and the related animal welfare described in this project proposal. Especially when the test compound is planned to be administered *in vivo*, any previous knowledge about the test compound's characteristics (e.g. tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics) will be requested from the client and will be taken into account in our decision whether to accept the particular study request. At any time, the researcher is in full control of the animal experiments. This is now added in 3.4.2. (in blue font).
 - om *in-vivo* of *ex-vivo* stoffen toe te dienen (ter analyse van de effecten)
Whether compound will be administered *in vivo* or applied to tissue/cells *ex vivo* depends on the proposed time course of the effect. Short term modulations of ion currents may be assessed by *ex vivo* administration (e.g. compound-receptor interactions of fast acting channel blockers of lidocaine-like action on sodium channels), whereas e.g. long term changes in neuronal connectivity or protein (ion channel) expression may best be addressed by (chronic) *in vivo* administration prior to *ex vivo* electrophysiology (e.g. slow acting (potential) antidepressants like SSRIs). This is now added in 3.4.2.
 - wat u precies in de *ex-vivo*-slices gaat meten

Actual parameters that are measured in the *ex vivo* slices will differ among individual studies and will be advised to the client such that they are best suited to answer the client's study research question(s). Decision of this choice is largely driven by our experimenter's expertise and literature resources. We are able to measure parameters that are standard to the respective techniques (manual patch-clamp (MPC) or multi-electrode arrays (MEA)).

MPC: The so-called whole-cell configuration allows for measurement of transmembrane currents or membrane potential. Currents can be synaptic currents or currents distinct ion channel types (i.e. voltage-gated sodium channels). Measurements of membrane potential allows i.e. for detailed examination of action potential properties and firing rates (i.e. excitability assessment upon depolarizing current injections to the subject cells (rheobase measurement)).

MEA: Extracellular potentials are measured via metal electrodes. Potentials originating from the firing activity of individual cells (single-unit spikes) or field-potentials originating from population or synaptic activity can be recorded. Synaptic field potentials are examined for the study of synaptic plasticity like long-term potentiation (LTP) of synaptic connectivity upon fiber stimulation. This is now added in 3.4.1.

- hoe u de parameters toepast in uw statistische analyse
In most cases, group data is compared (e.g. non-treated, treated, vehicle). Thus, depending on the order of measurements, paired or unpaired t-test or ANOVA (or their non-parametric equivalents) will be used. For example, firing rate or size of a sodium current would be compared across the different treatment groups. In most cases a baseline value can be recorded followed by exposure to the test compound (or vehicle/no-treatment) and statistically analyzed with a repeated measures ANOVA. Appropriate power analyses will be performed ahead of the study based on literature values or pilot data. This is now added in 3.4.1.
 - hoelang (in de tijd) u goede metingen mogelijk acht
Ex vivo brain slices can be kept viable for 6-8 hours depending on several factors such as the brain region and the age of the animal. Cell culture from cells obtained from *ex vivo* tissue can be maintained for days to weeks depending on the cell types and the brain region of origin. This is now added in the Appendix 2A.
2. Bij 3.3.2: Is het mogelijk dat u een belangrijke groep bent vergeten, namelijk de proefdieren die worden gebruikt in dit project? Dit zijn andere dieren dan de door u genoemde dieren die u denkt in de toekomst te kunnen besparen. (De eerste groep heeft een nadeel, de laatste groep een voordeel.)
Indeed, there are two groups of (potential) subject animals: those subjected to the *ex vivo* electrophysiology and those that may not be required for *in vivo* electrophysiology due to upfront use of the *ex vivo* approach. We now included the former group of animals as stakeholders in 3.3.2.
Animals used for *ex vivo* electrophysiology are not subjected to discomfort that would arise if electrophysiological recordings would be performed *in vivo*. Moreover, treatment of brain slices or cells *ex vivo* can be performed in most cases so that discomfort of *in vivo* treatment is limited to the cases where this is required by the research aim (i.e. due to slow pharmacokinetics or because chronic treatment is requirement). Hence, for most animals used, discomfort is limited to that of termination under anesthesia.
 3. Bij 3.4.1: Kunt u toelichten waarom u *ex-vivo*-slices nodig heeft en bijvoorbeeld organoïden geen alternatief kunnen zijn? U kunt dit eventueel ook benoemen bij de 3Rs.
Organoids may be composed of distinct types of neurons that can be found in relevant brain areas. However, the connectivity among these neurons within

organoid structures differs substantially from that of "real" brains. So far, organoids may serve as substitute for certain aspects of neuronal cell-physiology but still fall short in mimicking the complexity of originally developed animal brains. *Ex vivo* brain slices combine access to cells within their natural structure with a great reduction of discomfort to the animals – a combination that to our knowledge currently cannot be achieved with other (potential) substitute techniques. This has now been added in the Appendix at the 3Rs (2G).

Bijlage 1

4. Bij 2A: U noemt modellen voor bepaalde hersenaandoeningen, terwijl het lijkt of er alleen sprake is van het gebruik van naïeve, wildtype dieren. Kunt u dit uitleggen? Maakt u wel of niet gebruik van ziektemodellen?
In fact, disease models were not specifically mentioned in 2A. That is because only naïve wildtype animals will be used. We did mention that we plan "to study the physiological mechanisms" underlying "neurological conditions like neurodegenerative or neuropsychiatric conditions", however, no (genetic) models for these conditions are planned.
 5. Bij 2B: U noemt het gebruik van oude dieren. Kunt u specificeren tot welke maximale leeftijd deze dieren gebruikt zouden worden en of er sprake is van bijkomend ongerief door de (hoge) ouderdom (bijvoorbeeld door spontane tumorvorming)?
We may use animals up to an age of 18 months (now added in 2B). Age-specific compromises of welfare will be addressed by additional care and, if required, specific relieving treatment.
The emergence of tumors will be regarded as a humane endpoint (now added in 2D and 2E).
 6. Bij 2G: U geeft aan dat het toedienen van onbekende *compounds* ongewenste bijeffecten zou kunnen opleveren en dat dit mogelijk met meer dan matig ongerief gepaard zal gaan. U geeft aan dat u zult overwegen een behandeling of een humaan eindpunt toe te passen. Kunt u aangeven wat dit betekent voor het ongerief van de dieren? Zou er ook sprake kunnen zijn van ernstig ongerief? Zo ja, voor welk percentage dieren?
We do not expect any "ernstig ongerief" in these animals. Any discomfort exceeding "matig" is considered a humane endpoint and as soon as we have an indication that an animal with moderate discomfort is deteriorating beyond that, it will be terminated. This is not something that we expect to happen, but a rare possibility that we cannot exclude completely.
 7. Bij bijlage 1, 2H: Kunt u aangeven waarom hergebruik van dieren niet mogelijk is?
Animals are required to be naive in respect to any other previous pharmacological treatments. Animals that are occasionally available for reuse at our facility do not fulfil this requirement.
- NTS
8. De NTS bevat zeer veel jargon. Kunt u deze herschrijven in leken taal?
We have now replaced (or in some places explained) jargon like: *in vivo*, *ex vivo*, narcose, isoleren, toediening, fysiologie.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
Voor dit onderzoek zijn dierproeven nodig met bovendrempeling ongerief en dus is de aanvraag vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? Ja de DEC is competent hierover te adviseren.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.
Indien van toepassing, licht toe waarom. Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld). Het betreft de aanvraag voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden die de symptomen en het lijden van patiënten met aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) moeten helpen te verlichten. De aanvrager noemt de voorbeelden Alzheimer, Parkinson's & Huntington, schizofrenie, multiple sclerose, chronische pijn, epilepsie, en andere (ook zeldzame) vormen van congenitale ziekten die momenteel onvoldoende adequaat behandeld kunnen worden. De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld die verhelderend zijn beantwoord. De aanvraag volgt voorbeeld 4b uit de handreiking definitie project.
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is geen sprake van tegenstrijdig wetgeving voor zover de DEC bekend.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie (toegepast/translationeel onderzoek) sluit aan bij de hoofddoelstelling om bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld).
Het directe doel is om vragen van opdrachtgevers op dit gebied te kunnen helpen beantwoorden. Het uiteindelijke doel is om een dieper begrip te krijgen van de functionele onderbouw van neuronale aandoeningen en om informatie te verkrijgen over het mechanisme van nieuwe medicijnkandidaten voor potentiële

behandelingen. Daarmee zouden uiteindelijk nieuwe therapieën voor deze aandoeningen ontworpen kunnen worden.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld). De belanghebbenden zijn:
- opdrachtgevers (sponsors) met een gerichte vraag op dit gebied, met het belang hun vragen beantwoord te krijgen en bij te dragen aan medische vooruitgang
 - de vragende instelling, met het economische belang hun opdrachtgevers te kunnen helpen en dus te kunnen voortbestaan, en het belang om bij te dragen aan medische vooruitgang;
 - potentiële patiënten, met het belang hun leven en hun welbevinden;
 - de proefdieren, met het belang hun leven en welbevinden.
6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Neen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5). De aanvragers hebben zeer veel ervaring op dit gebied, zowel wetenschappelijk als voor de benodigde proefopzet en de uitvoering van de beoogde experimenten, hetgeen uit hun gevestigde naam en diverse publicaties blijkt.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6). De DEC vindt het project goed opgezet en helder beschreven. Echter, in eerste instantie ontbrak op een aantal punten een heldere strategie. De DEC heeft hier een uitgebreide vraag met deelvragen over gesteld (vraag 1), waarna de strategie door de aanvrager goed is opgehelderd. De instelling van de aanvrager maakt deel uit van een **5.1 lid2h** met een brede expertise in de ontwikkeling van nieuwe behandelingen binnen Nederland en wereldwijd. De sponsors die het onderzoek aanvragen zijn wereldwijd gevestigd farmaceutische en biotechnologische bedrijven en academische instellingen. De faciliteiten zijn volgens de AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) geaccrediteerd. De onderzoekers hebben ruime ervaring in verschillende aspecten van de ontwikkeling van geneesmiddelen en zijn in staat om vakkundig advies te geven over de planning van de experimenten en de interpretatie van de resultaten. De haalbaarheid van de beschreven experimenten wordt gewaarborgd door het hoogopgeleide en ervaren personeel. De hoofdwetenschapper heeft meer dan 13 jaar ervaring met de technieken in academische en industriële omgevingen.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod) voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden). N.v.t.

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De vraag is door de onderzoekers beantwoord met ja, huisvesting volgens bijlage III.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). 70% van de dieren zal onder anesthesie (terminaal) worden gedood om biologisch materiaal uit te nemen voor verder ex-vivo onderzoek. Omdat het om hersenmateriaal gaat waarvan de electrofysiologie post-mortem behouden moet blijven, is snelheid een voorwaarde. Daarom kan het materiaal niet worden afgenomen na euthanasie. Omdat de dieren onder anesthesie worden gebracht, zijn zij ingeschat op mild ongerief. De categorie mild ongerief is aangevuld met nog 20% van de dieren tot 90%, omdat de overige dieren gebruikt zullen worden voor de evaluatie van potentiële farmaca, waarvoor o.a. het toedienen van het farmacon en het afnemen van bloed noodzakelijk is. Deze 10% zal hierdoor matig ongerief ondergaan, vanwege de veelheid aan handelingen. De DEC heeft met de vragen 5 en 6 doorgenvraagd naar het ongerief om over de oudere dieren en eventuele bij-effecten van stoffen bij diverse dieren meer duidelijkheid te krijgen. De vragen zijn helder beantwoord en de DEC staat achter deze inschatting.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).
De integriteit van het dier wordt aangetast door het gebruik van het dier als proefdier en door diverse invasieve handelingen, zoals het toedienen van farmaca, het afnemen van bloed en het doden van het dier. Daarnaast zouden de farmaca ongewenste bijwerkingen kunnen veroorzaken.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
De algemene criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd, en worden in principe niet verwacht.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3). De DEC is van mening dat dit aannemelijk is gemaakt. In de meeste gevallen zijn de experimentele verbindingen al geëvalueerd in mitotische cellijnen of (menselijke) vereeuwigde cellijnen die de relevante receptor(en)/ionkanalen(en) uitdrukken voor een principiële begrip van de interactie

met hun doelreceptor. De methoden die hier worden beschreven, maken een functioneel begrip in levensvatbare neuronen mogelijk en vormen een belangrijke tussenliggende translationele stap tussen vroege mechanistische inzichten op receptorniveau en in vivo-evaluatie van het effect. De bestudering van natuurlijke synaptische connectiviteit van CZS-segmenten kan momenteel niet worden vervangen door cellijnen. Recente vooruitgang op het gebied van in silico modellering van neuronale functie kan een nuttige eerste stap in de ontwikkeling van geneesmiddelen bieden. Aangezien deze modellen echter zijn gebouwd op basis van aannames die zijn afgeleid van elektrofysiologische metingen onder gecontroleerde omstandigheden, zijn ze van nature onvoldoende om onbekende aspecten van werkingsmechanismen en functionele implicaties van experimentele verbindingen te onthullen die alleen kunnen worden geëvalueerd in levensvatbare neuronen of cellen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
De in de aanvraag beschreven procedures maken het mogelijk om meerdere CZS-segmenten of primaire celkweken van één dier te verkrijgen. Het behoud van de levensvatbaarheid van de cellen in de plak of in de cultuur stelt de onderzoekers in staat om meerdere metingen uit te voeren van het biologische materiaal dat van één dier is afgeleid. Bovendien is het in de meeste gevallen mogelijk om verschillende elektrofysiologische kenmerken in één cel te meten, waardoor de vereiste hoeveelheid weefsel en dus het aantal dieren verder wordt verminderd.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
Ex vivo elektrofysiologische experimenten kunnen op zichzelf al worden beschouwd als een verfijning, met het voordeel dat de metingen worden uitgevoerd in weefsel en celkweek. De proefdieren waaruit het weefsel is verkregen, ervaren geen effecten van de elektrofysiologische metingen. Niettemin kan licht tot matig ongemak optreden als dieren worden voorbehandeld met experimentele verbinding. Negatieve effecten geassocieerd met de experimentele verbinding zullen zoveel mogelijk worden geminimaliseerd met helder beschreven voorwaarden.
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. Niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld). Daar waar dit kan zal voor het verzamelen van biologisch materiaal gebruik worden gemaakt van beide geslachten. Een deel van het onderzoek zal alleen in mannetjes worden uitgevoerd om aan te sluiten bij eerder uitgevoerd onderzoek.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt

wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3). Dieren worden in het kader van de proef gedood om dat ex-vivo of post-mortem onderzoek van de weefsels noodzakelijk is.

20. Indien dieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. N.v.t.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Ja de NTS is een evenwichtige weergave van het project. Na de vraag van de DEC om deze te herschrijven, is deze ook in begrijpelijke taal gesteld.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).
Rechtvaardigt het doel, namelijk het onderzoek (in opdracht van sponsors) naar het ontwikkelen van nieuwe behandelmethode die de symptomen van patiënten met aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) lijden kunnen helpen te verlichten, het ongerief van 300 ratten en 300 muizen met (evenredig verdeeld) 90% mild en 10% matig ongerief?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoetgekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).
Zowel de instelling als de opdrachtgever aan de instelling hebben een economisch belang en een belang om bij te dragen aan de medische vooruitgang. Deze beide soorten belangen zijn uiteraard met elkaar verweven (economisch belang *door* bij te dragen aan de wetenschap). De DEC acht dit belang zeer klein in verhouding tot de belangen van patiënten en de proefdieren.
De patiënt heeft een groot moreel belang bij het vinden van een goede therapie voor de beschreven aandoeningen, omdat daar vaak nog geen goede therapie voor is. Hoewel niet concreet aantoonbaar is dat er ook therapieën gevonden zullen worden, is de kans redelijk dat er stappen in die richting gemaakt zullen kunnen worden. Ook het belang van de proefdieren weegt zwaar, maar is beperkt wegens het relatief lage aantal proefdieren en het redelijk beperkt blijven van het ongerief en de schending van de integriteit. De DEC is van mening dat vooral het belang van de patiënten hier zwaar weegt, zwaarder dan de andere belangen, gezien de grote medische (en ook wel maatschappelijke) consequenties van de aandoeningen en het gebrek aan goede behandelmethode.
3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en

regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld).

Op grond van de argumenten bij 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het gerechtvaardigd is dit onderzoek (in opdracht van sponsors) naar het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden voor aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) te verrichten, waarbij het beperkte ongerief en de inbreuk op de integriteit van de 600 ratten en muizen minder zwaar weegt. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is 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 kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld).
Het advies is in consensus tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).
N.v.t.



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'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Motivation

The motivation for this research lies in the development of new treatments that can be used to cure or alleviate symptoms in patients suffering from conditions of the nervous system. Many neurological and psychiatric conditions including but not limited to Alzheimer's, Parkinson's & Huntington's disease, schizophrenia, multiple sclerosis, chronic pain, epilepsy and rare congenital conditions currently cannot or can only insufficiently be treated. It is at the moment still impossible to cure neurodegenerative conditions retreating only to lighten symptoms or slow-down disease progression. These conditions create enormous suffering for the patients and their surrounding as they progress to a fatal end.

Background

5.1 lid2h, among other activities, conducts 5.1 lid2h to help pharmaceutical companies and academic institutions gain detailed insight into the possibilities of their experimental substances to potentially serve as new treatments against these conditions. With a plethora of techniques and methods, we are able to test drug candidates for their mechanism of action, efficacy and bioavailability. The *ex vivo* electrophysiological approach eliminates discomfort from the animals that would otherwise be present if electrophysiological recordings would be performed *in vivo*. *Ex vivo* electrophysiological evaluation of neuronal activity in cells that are exposed to different pharmacological conditions can help to advance the understanding of neurological conditions and identify pharmaceutical approaches that may lead to new treatments. This can be achieved by providing focused expertise and by utilizing state-of-the-art techniques to evaluate these test substances faster and thus with lower financial burden to the society.

Context

The project outlined here relates to a continuation of an existing project within our organization. Over the past five years, under project approval AVD 5.1 lid2h 2016534 (previously 5.1 lid2h 2016534), potential new treatments targeting conditions of the nervous system have been evaluated for our sponsors. In the first 4 years of the approval (2016-2020) about 20 studies were conducted that helped our sponsors to understand the effect(s) of their experimental compounds and to make informed decisions about progressing them to further drug development stages.

3.2 Purpose

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

- If applicable, describe all subobjectives

The purpose of this project is the acquisition of translational knowledge about the electrophysiological effects of potential new treatments in relevant regions of the nervous system or other electrically active tissue. Purpose is the study of the efficacy of substances to engage with their target (e.g. receptor or ion channel) and the associated effects on the electrical activity of the cells. Examples of this activity are the cell's capability to fire action potentials (excitability), the synaptic connectivity and modulation of synaptic strength (learning and memory), as well as currents of distinct ion channel types that are targets of pharmacological modulation. Moreover, possible side-effects on the electrophysiological function of individual cells or groups of cells can be assessed (e.g. epileptiform activity or undesired effects on certain ion channels) and characterized as an early indication of the safety profile that would then have to be further evaluated in regulatory safety studies. The acquired information is essential to ensure good translation towards *in vivo* animal models and ultimately towards clinical evaluation. Finally, the information may also become part of documentation associated with IND-filing (IND = Investigational New Drug) to obtain approval for first-in-human study.

Immediate goals

The immediate goal of the studies is the postmortem collection of tissue. The tissue will be used to obtain tissue slices or primary cells for direct use or culture with viable cells/neurons. From these cells, measurements of one or several relevant electrophysiological parameters are performed. Advanced methods to record minute electrical signals *ex vivo* are utilized in conjunction with application of potential new treatments or controls (e.g. specific (ant-)agonists or modulators of ion channels). The complex

electrical signals are analyzed with refined methods and meaningful information are extracted for conclusive evaluation of potential new treatment and compounds. Electrophysiological recording performed from such preparations have the advantage over i.e. differentiated stem cells that the synaptic connectome is preserved (tissue slices) and that the ion channel expression closer matches the *in vivo* situation.

Ultimate goals

The ultimate goals are to gain a deeper understanding of the functional underpinnings of neuronal conditions and to acquire information about the mechanism by which drug candidates could serve as new treatments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust due to genetic conservation (Jegla et al., 2009).

Given that the sponsors request our services and expertise at different development stages of their potential new treatment, detailed immediate and ultimate goals may differ per sponsor and compound. The research question that we are requested to address by the sponsors depends on the existing knowledge about properties of the compound, on the in-house expertise and laboratory options of the sponsor and on which aspects they intend to outsource to us or other 5.1 lid2h. Together with the sponsor, the researcher designs studies to best answer their research question in the light of the research expertise and capabilities at our site and at other sites within 5.1 lid2h.

Examples of such research questions are:

- Does a potential new treatment change a particular electrophysiological parameter (e.g. ion channel current)?
- What is the dose-response relationship of a potential new treatment on a particular electrophysiological parameter (indicative of a future therapeutic range *in vivo*)?
- Is the effect of a potential new treatment specific to a certain target (e.g. ion channel)?
- Can a pharmacologically evoked *ex vivo* disease phenotype (such as pharmacologically induced epileptic seizures in hippocampal slices (Steidl et al., 2019) be addressed by the experimental substance?
- Is the effect of the investigated new potential treatment superior to effect(s) of existing medications (also in context of side-effects)?
- Are there side-effects of a potential new treatment on electrophysiological parameters?

We aim to continuously develop and optimize the established methods in the light of the latest scientific and methodological progress so as to increase quantity and quality of obtained data and to contribute to increase the success rates in drug development efforts.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The license holder is a Dutch subsidiary of 5.1 lid2h with a broad set of expertise in development of new treatments within the Netherlands and worldwide. Our sponsors are globally located pharmaceutical and biotechnology companies as well as academic institutions. The facilities at our site are AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) accredited.

Our researchers have broad experience in various aspects of drug development and are able to provide proficient advice on the planning of the experiments and the interpretation of the results. Feasibility of the described experiments is ensured by our highly skilled and experienced personnel congregating many years of applying these techniques within our company location. The lead scientist has more than 13 years of experience with the techniques in academic and industrial settings. The biotechnicians are authorized and competent to carry out animal the related actions.

From the methodological perspective, we rely on established techniques that have been successfully used and expanded at our site for the last years covered under the previous project license (AVD5.1 lid2h 2016534).

Individual studies are designed and executed to provide answers to each sponsor's specific research question and typically have durations of several weeks from experimental work to data analysis and reporting. Thus, it is feasible to conduct multiple studies within the 5-year span of the project request.

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 and describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

To be able to execute these studies, it is important that the facility not only complies with the *Wet op de dierproeven* but also with adjacent laws and regulations such as the *Opiumwet*. The related appropriate permits are in place, and therefore these law and regulations will not negatively affect welfare of the animals or the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

According to the WHO, many millions of people worldwide are affected by a neurological condition – with far-reaching social and economic consequences. In the light of the demographic change it is expected that these numbers and the associated burden will further increase over the next decennia. Despite the fact that several hundreds of potential new treatments are under development at any given time, for years, only about 10-15 new treatments are approved per year (Medicines in Development for Neurological Disorders 2013, 2018).

Many drug candidates fail in late stages of development, often even as late as during clinical phases. This is a situation that leads to enormous delays and exorbitant development costs in order to obtain effective and safe treatments – eventually keeping patients' needs unmet.

It is therefore of utmost importance to characterize new neurological treatments for their potential in early stages of the (pre-clinical) development by reliable translational methods. The methods described in this application are particularly well suited to understand the functional underpinnings of neurological conditions as well as to evaluate drug candidates for their potential to serve as remedies for these conditions. The *ex vivo* approach allows for direct observation and measurement of cells in a preparation that preserves most physiological properties of the cellular function as in the intact animal, while it allows for defined pharmacological conditions and for multiple measurements from the derived tissue and effectively reduces the number of animals used. Moreover, it allows for increased throughput in evaluating (screening) compounds for their potential to be advanced further into clinical evaluation.

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

The experiments are conducted for our **sponsors** and will provide data to help them to make decisions on advancing potential new treatments for further (pre-)clinical development on the basis of the substance's effect on cellular electrical activity and information processing.

The information derived from these experiments is used to identify suitable candidate substances that have the potential to serve as treatment in the future. It is therefore required to understand their effectiveness (and effective dose) on the cellular target (e.g. receptor or ion channel) and the consequences on electrical signaling.

Animals used for *ex vivo* electrophysiology are not subjected to discomfort that would arise if electrophysiological recordings would be performed *in vivo*. Moreover, treatment of brain slices or cells *ex vivo* can be performed in most cases so that discomfort of *in vivo* treatment is limited to the cases where this is required by the research aim (i.e. due to slow pharmacokinetics or because chronic treatment is requirement). Hence, for most animals used, discomfort is limited to that of termination under anesthesia. Furthermore, *ex vivo* assessment of cells contributes to the reduction of the use of **animals** as it forms an important and decisive pre-requisite before shift of focus on further *in vivo* experiments; first by eliminating non-effective substances from the development pipeline and second by guidance towards a meaningful dosing range.

In the clinical phase it is an ethical obligation to protect the **study participants** against avoidable harm or suffering. Therefore, medical ethical boards require solid data from pre-clinical research before granting clinical trials with an experimental substance. Mechanistic data on a substance's function at the cellular level is indicative of the possible range of undesired (side-)effects and the research described in this project proposal contributes to deepen understanding in this domain.

Our studies contribute to our sponsors' aim to provide their potential new treatments to patients. Ultimate stakeholders are therefore the **patients**, their families and their social sphere.

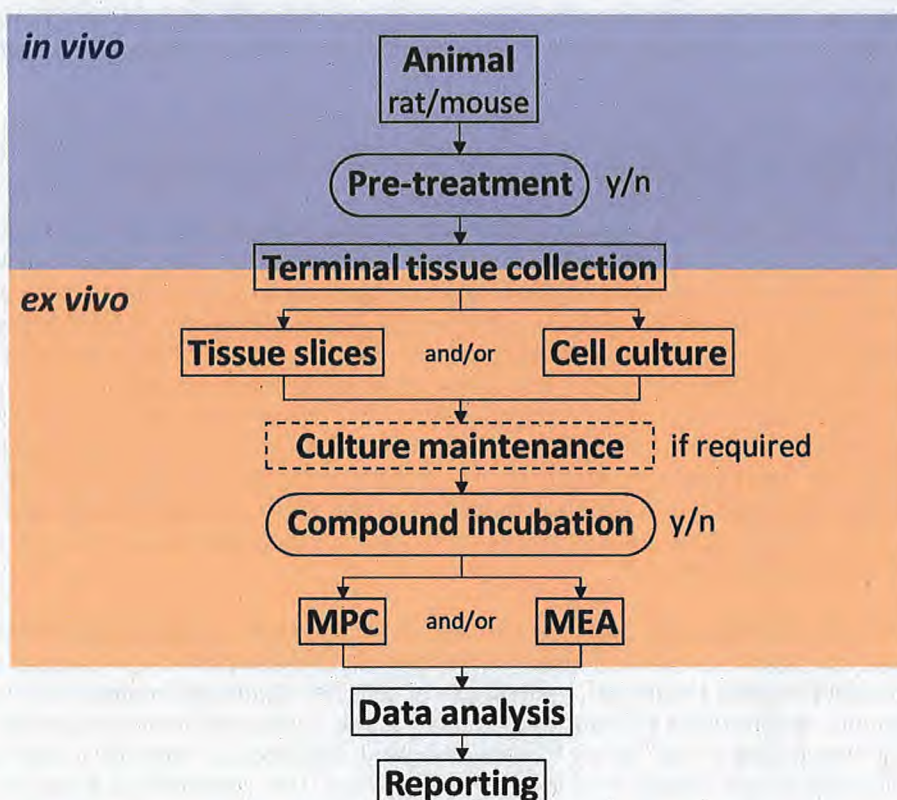
3.4 Strategy

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.

We enable our sponsors to gain insight into the mechanism of action of their drug candidates by tailored electrophysiological examination of compound effect on tissue/cells from animals (rat/mouse).

As visualized in the diagram below, experiments will consist of the following steps:

- 1) Arrival of animals and (group) housing in holding room
- 2) Optional acute or chronic (pre-)treatment with potential new treatments / compounds
- 3) Termination of individual animals under anesthesia
- 4) Post-mortem tissue collection
- 5) Processing of tissue to obtain multiple tissue slices or primary cell culture from the relevant brain region
- 6) *Ex vivo* electrophysiological assessment by manual patch-clamp (MPC) and/or multi-electrode array (MEA) under defined pharmacological conditions (reference compound and/or test compound / potential new treatment)
- 7) Data analysis and reporting of results



Actual parameters that are measured in the *ex vivo* slices will differ among individual studies and will be advised to the client such that they are best suited to answer the client's study research question(s). Decision of this choice is largely driven by our experimenter's expertise and literature resources. We are

able to measure parameters that are standard to the respective techniques (manual patch-clamp (MPC) or multi-electrode arrays (MEA)).

MPC: The so-called whole-cell configuration allows for measurement of transmembrane currents or membrane potential. Currents can be synaptic currents or currents distinct ion channel types (i.e. voltage-gated sodium channels). Measurements of membrane potential allows i.e. for detailed examination of action potential properties and firing rates (i.e. excitability assessment upon depolarizing current injections to the subject cells (rheobase measurement)).

MEA: Extracellular potentials are measured via metal electrodes. Potentials originating from the firing activity of individual cells (sing-unit spikes) or field-potentials originating from population or synaptic activity can be recorded. Synaptic field potentials are examined for the study of synaptic plasticity like long-term potentiation (LTP) of synaptic connectivity upon fiber stimulation.

In most cases, group data is compared (e.g. non-treated, treated, vehicle). Thus, depending on the order of measurements, paired or unpaired t-test or ANOVA (or their non-parametric equivalents) will be used. For example, firing rate or size of a sodium current would be compared across the different treatment groups. In most cases a baseline value can be recorded followed by exposure to the test compound (or vehicle/no-treatment) and statistically analyzed with a repeated measures ANOVA. Appropriate power analyses will be performed ahead of the study based on literature values or pilot data.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The herein described animal experiments have in common that tissue collected from animals is used for research on (neurological) conditions and for the development of new treatments. The applied techniques are broadly applicable as the measurements directly or indirectly address the receptors and ion channels present in the membrane of cells. These vary across different cell types and tissues but can be studied with the same techniques. The techniques can be used to study electrophysiological differences on a fundamental level.

The differences can be:

- between (naïve) cells
- between cells of different brain regions
- in the presence or absence of experimental compounds and/or reference compounds

The strategy described above rests on the technical advantage of the herein applied methods to keep cells viable outside of the donor animal. As an advantage over *in vivo* methods, the *ex vivo* approach allows for better access to the cells and for sensitive measurements while the environmental factors (composition of solutions in which the tissue slices/cells are kept in) can be fully controlled. In contrast to *in vivo* preparations, the *ex vivo* setting allows for rapid wash-in and wash-out of test compounds as well as of reference compounds. These reference compounds typically are well characterized selective agonists or antagonists to a certain target (e.g. ion channel) and enable us to pharmacologically dissect the effect and unravel the mechanism of action of the investigated experimental substance. While the approach is reductionist, it allows for answering questions on the mechanism(s) underlying a certain condition as well as on the effects of substances on the electrophysiological parameters of cells and their potential to be used as new treatment.

For the individual studies, together with the sponsor, a study design is determined that is best suited to answer the (specific) research question. Factors like the selection of the most informative electrophysiological parameter, optimal use of collected tissue and measurements from multiple cells are taken into consideration in order to (1) minimize the number of animals required, (2) reduce the discomfort in case *in vivo* (pre-) treatment is used. Decisions on whether a particular study request is accepted by us will depend on a feasibility evaluation. This evaluation is driven by the expertise of our personnel/experimenters and by our technical capabilities to answer the specific research question. Furthermore, it will be ensured that the study request is in agreement with the animal experiments and the related animal welfare described in this project proposal. Especially when the test compound is planned to be administered *in vivo*, any previous knowledge about the test compound's characteristics (e.g. tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics) will be requested from the client and will be taken into account in our decision whether to accept the particular study request. At any time, the

researcher is in full control of the animal experiments. Whether compound will be administered *in vivo* or applied to tissue/cells *ex vivo* depends on the proposed time course of the effect. Short term modulations of ion currents may be assessed by *ex vivo* administration (e.g. compound-receptor interactions of fast acting channel blockers of lidocaine-like action on sodium channels), whereas e.g. long term changes in neuronal connectivity or protein (ion channel) expression may best be addressed by (chronic) *in vivo* administration prior to *ex vivo* electrophysiology (e.g. slow acting (potential) antidepressants like SSRIs).

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	Tissue collection from mice and rats for <i>ex vivo</i> electrophysiological measurements
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information 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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Tissue collection from mice and rats for <i>ex vivo</i> electrophysiological measurements

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Experimental approach

The animal experiments are performed in order to collect postmortem tissue for *ex vivo* electrophysiological measurements. In some cases, animals will be subject to pre-treatment with experimental compounds / potential new treatments.

Neurological conditions like neurodegenerative or neuropsychiatric conditions, or (chronic) pain are accompanied by changes in electrical signaling among (neuronal) cells. *Ex vivo* electrophysiology provides an outstanding possibility to study the physiological mechanisms (e.g. by infusion of selective (ant-)agonists or modulators of ion channels) and the effect of potential new treatments on the level of individual cells as well as their local network. The techniques allow for the measurement of minute electrical signals associated with neuronal/cellular information processing and electroactive function.

Ex vivo electrophysiology techniques used at our research facility are manual patch-clamp (MPC) and multi-electrode arrays (MEA).

MPC: This technique builds on direct physical contact of a glass capillary electrode with the subject cell either in tissue slices or cell culture. It is considered the gold-standard for the most comprehensive understanding of the electrical state of a cell – and allows for measurements ranging from action potential and synaptic activity to individual ion channel currents.

MEA: This technique makes use of arrays of metal electrodes that pick up extracellular signal of neuronal activity. It is particularly suited for the examination of populations of neurons for their spontaneous activity, for mechanisms of synaptic plasticity (associated with learning and memory, processes impaired in many neurodegenerative conditions e.g. Alzheimer's disease) and for synchrony of electrical activity (e.g. epilepsy).

Primary outcome parameters

Primary outcome parameter of the animal study is the obtained tissue which will then be used to generate tissue slices or primary cell culture.

Secondary outcome parameters

Secondary outcome parameters are associated with measurements of the electrophysiological state of the neurons/cells (within tissue slices or from tissue based primary cell culture) and include but are not restricted to:

- 1) General electrophysiological properties (i.e. resting membrane potential, membrane resistance, and membrane capacitance)
- 2) Properties of spontaneous or stimulated action potentials (i.e. frequency and amplitude)
- 3) Properties of spontaneous or stimulated synaptic potentials and currents (i.e. frequency and amplitude)
- 4) Transmembrane currents originating from ion channels (identified by distinct activation protocols and specific pharmacological isolation)
- 5) Population (synaptic) activity of groups of neurons (e.g. associated with learning and memory, or epilepsy)

The set of parameters assessed in a particular study is determined by the research question and the proposed mechanism by which the experimental compounds are expected to act on the cells. These parameters are standard parameters for the MPC or the MEA techniques.

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

Animals are received at the vivarium and kept in open or individually ventilated (IVC) cages (according to directive EU 2010/63).

Depending on the experimental design it may be required to treat the animals before termination (under general anesthesia). Individual animals may be dosed once or several times (maximum 60 times in total, e.g. 2 months daily, or 1 month twice daily) with test compound(s) (experimental and/or reference compound or vehicle).

Possible routes of administration are among others:

- subcutaneous
- intraperitoneal
- oral (per gavage or as part of the diet)
- rectal
- intranasal
- intravenous
- intramuscular

To determine concentrations of test compound, blood samples may be collected terminally or during (chronic) dosing (via cheek-vein puncture for mice or tail-vein puncture for rats). In the case that blood samples are collected during the *in vivo* phase, this will be up to a maximum of 10% of the blood volume taken within up to 1 week. After the animal is anesthetized and subsequently terminated according to annex IV of directive EU 2010/63, central nervous system (CNS), peripheral nervous system (PNS) or other electrically active tissue will be collected. The tissue will be extracted from the animal as fast as possible and processed further. Additionally, further tissue could be collected to, for example, determine the test compound levels.

Tissue processing for *ex vivo* electrophysiology can be:

- Generation of tissue slices utilizing a precision cutting apparatus (i.e. a vibratome)

- Isolation of individual cells, creating a primary culture, by means of chemical and mechanical dissociation

Electrophysiology may be performed directly after tissue processing or after further culturing for prolonged time in suitable conditions.

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

The number of required animals for a given study is primarily determined by the expected number of successful measurements per collected tissue from one animal, and by the number of measurements required for statistical robustness. To determine the required number of measurements/animals - statistical power-analysis is used (online available software G*Power: <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>)

The expected number of successful measurements per collected tissue depends on:

- whether the study question can be best answered by using tissue slices or primary cell culture
- the time required for the individual measurements in context of *ex vivo* survival of the tissue slices or primary cells.
- the number of relevant tissue slices or cells that can be obtained from one animal

The number of required measurement repetitions primarily depends on the expected intrinsic variance of the electrophysiological parameters of the different cell/receptor (sub-)types. If an experimental compound is tested, the variance in response, number of different concentrations and relevant controls will also determine the number of required animals.

Typical group sizes are 5 animals. From each animal, it allows for the generation of several brain slices (i.e. 3-4 brain slices from hippocampus), or to obtain primary cells (i.e. $2-5 \cdot 10^5$ cells from dorsal root ganglia) which are seeded on multiple coverslips. *Ex vivo* brain slices can be kept viable for 6-8 hours depending on several factors such as the brain region and the age of the animal. Cell culture from cells obtained from *ex vivo* tissue can be maintained for days to weeks depending on the cell types and the brain region of origin. Each individual slice or coverslip can be used for one or several measurements - thereby substantially reducing the number of required animals. If the experimental design allows, repeated measurements from the same cells are performed to increase statistical power (i.e. cells exposed to several subsequent pharmacological conditions including vehicle control). Furthermore, subsequent analysis of the data after each animal allows us to determine if sufficient data has been collected or if additional animals may be used.

B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mouse	1) animals bred for use in procedures	Early postnatal up to adult/aged	300	Male and female	No	
2	Rat			300			

Provide justifications for these choices

Species	Mice and rats will be used for the experiments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust. They are also the species most often used for other studies by the sponsor, therefore their use ensures the comparability to those other studies.
Origin	All animals will be sourced from certified breeders.
Life stages	Depending on the study requirements, young up to adult animals (up to an age of 18 months) will be used for tissue collection. For primary cell culture, we would mostly use early postnatal animals.

Number	The numbers are considered the expected maximum to be used and may be less. Within the last 5 years studies on average consisted of 4 groups with 5 animals per group. We expect to perform a maximum of 15 studies on each species.
Gender	In most cases, males will be used to ensure the set up matches to other studies by the sponsor. However, males and females may be used if tissue is collected from postnatal animals and if gender is not a relevant factor for the research question. During the development of the study plan, the gender of the animals is considered with the sponsor and the scientific importance of using both genders for evaluation of effects of new potential medication is emphasized.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Predominantly C57Bl/6 mice and Sprague Dawley or Wistar rats will be used. Depending on the research question, sponsors may require us to use other standard strains.

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

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.

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

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

- 1) Before obtaining tissue post-mortem, animals may be acutely or (sub-)chronically administered experimental compound. Despite prior (*in vitro* and/or *in vivo*) testing, these compounds may cause unknown adverse effects.
- 2) If older animals are used, it is also important to consider age-specific compromises on welfare (for example (but not exclusive to) the formation of ulcers in older animals).

Explain why these effects may emerge.

- 1) The experimental compounds are often not fully characterized for their possible spectrum of adverse effects and may have not yet been (further) tested in animals. Therefore, it may be possible that unexpected adverse effects may emerge that may be observed for the first time. If a compound would show adverse effects exceeding moderate discomfort, relieving treatment is considered or animals will be euthanized as soon as possible.
- 2) If older animals are used, specific discomfort is mostly associated with aging as it would be experienced by elderly humans.

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

- 1) Negative effects associated with the experimental compound will be minimized as follows:
- In the context of designing the experiments, detailed information about the experimental compound will be requested from the sponsor. This information may predict potential emergence of discomfort.
 - After administration of experimental compound, animals will be monitored for signs of discomfort and adverse effect. Animal welfare will be evaluated utilizing an internal decision-tree. If required and reasonable, special care will be provided.
 - If effects emerge that were not foreseeable and/or not described in the decision-tree, in conjunction with the IvD and the veterinarian, measures will be evaluated to relieve the discomfort or, if required, to terminate the animals.
 - In most cases, one animal or a small group of animals will be subjected to tissue collection for the electrophysiology procedures. Therefore, emergence of adverse effects will likely show in first animal(s) taken into experiment. Hereby we can ensure that experimental compound related adverse effects can be addressed early and appropriate measures be taken.
- 2) The relevance/necessity of using older animals will be discussed in detail with the sponsor. Close monitoring of the animals will ensure that emergence of discomfort can be recognized early and special care accounting for the specific requirements can be given. The emergence of tumors will be regarded as a humane endpoint.

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.

In cases where animals are pre-treated, circumstances requiring humane endpoint implementation may arise with low likelihood.

Criteria for humane endpoints are described in the internal SOP *Animal discomfort and humane endpoints* and include parameters such as weight (in general weight-loss of more than 15% in short time), the emergence of tumors, fur condition, eye coloration, skin coloration, body temperature, mobility, and alertness.

Indicate the likely incidence.

Very low, <1%

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).

To obtain tissue for the electrophysiological measurements, animals are terminated under general anesthesia (i.e. isoflurane) without any previous procedures, the severity is therefore classified as mild (70% of animals). If animals are administered experimental compounds, with or without blood sampling before termination, the experiments are considered to cause mild (20% of animals) to moderate (10% of animals) discomfort depending on the frequency of the performed procedures. For the individual studies, the AWB will assess the cumulative discomfort of the animals based on all procedures performed on an animal.

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>In most cases, prior to the studies proposed here, experimental compounds have been evaluated in mitotic cell lines or (human) immortalized cell lines that express the relevant receptor(s)/ion channels(s) for a principle understanding of the interaction with their target receptor.</p> <p>However, use of these cell lines forms a highly reductionist approach and does not account for the complexity in connectivity and natural expression state. The methods described in this application allow for a functional understanding in viable neurons and form an important intermediate translational step between early mechanistic insights on the receptor level and <i>in vivo</i> evaluation of effect.</p> <p>Similarly, the study of natural synaptic connectivity from CNS slices currently cannot be substituted by using cell lines. Recent progress in (<i>in silico</i>) modelling of neuronal function may provide a useful initial step in drug development. However, as these models are built under assumptions derived from electrophysiological measurements under controlled conditions, they are naturally insufficient to reveal unknown aspects of mechanisms of action and functional implications of experimental compounds that only can be evaluated in viable neurons/cells. Organoids may be composed of distinct types of neurons that can be found in relevant brain areas. However, the connectivity among these neurons within organoid structures differs substantially from that of "real" brains. So far, organoids may serve as substitute for certain aspects of neuronal cell-physiology but still fall short in mimicking the complexity of originally developed animal brains. <i>Ex vivo</i> brain slices combine access to cells within their natural structure with a great reduction of discomfort to the animals – a combination that to our knowledge currently cannot be achieved with other (potential) substitute techniques.</p>
Reduction	<p>The herein described procedures allow for obtaining multiple CNS slices or primary cell culture from a single animal. Maintaining viability of the cells within the slice or in culture enables us to perform multiple measurements from the biological material derived from one animal. Moreover, in most cases it is possible to measure several electrophysiological characteristics (such as resting membrane potential, action potential firing and properties, synaptic connectivity) from one cell, thereby further reducing the required tissue and thus the number of animals.</p> <p>When collecting tissue for the electrophysiological experiments from non-treated animals it is also possible to harvest clean tissue(s) for reference material in bioanalytical studies. A separate license (AV5.1 lid21 20184846) is in place for collection of this type of tissue but harvesting tissue from animals under this license reduces the number of animals required for the other license.</p>
Refinement	<p><i>Ex vivo</i> electrophysiological experiments in themselves are considered a refinement for the advantage that the measurements are performed in tissue / cell culture and the subject animals from which the tissue was obtained do not experience effects of the electrophysiological measurements. Nonetheless, mild to moderate discomfort may arise if animals are pre-treated with experimental compound. Refinement of procedures to alleviate this potential discomfort have been described above for addressing of possible adverse effects.</p> <p><i>Ex vivo</i> evaluation of experimental compound serves an important gate-keeper function in decision making for advancing compounds to <i>in vivo</i> testing, thereby reducing the risk of unnecessary <i>in vivo</i> tests of non-effective compounds.</p>

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.

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.

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.

Not applicable. No legally required animal procedures.

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.

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.

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

The outlined experiments require the collection of tissue from essential organs for electrophysiological measurements that cannot be obtained otherwise. Thus, the animals will be terminated under anesthesia.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Animals will be decapitated under (deep) anesthesia.

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

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

1. Introduction
2. Literature Review
3. Methodology
4. Results
5. Discussion
6. Conclusion

7. References
8. Appendix
9. Bibliography

10. Acknowledgements
11. Author Biographies
12. Contact Information

13. Index
14. Glossary
15. Table of Contents

The first section of the document discusses the background and objectives of the study. It highlights the importance of understanding the current state of research in this field and identifies the specific research questions that the study aims to address. The methodology section describes the research design, data collection methods, and the statistical techniques used to analyze the data. The results section presents the findings of the study, including the main results and any significant differences observed. The discussion section interprets the results in the context of existing literature and discusses the implications of the findings. The conclusion summarizes the key points of the study and provides recommendations for future research.

The second section of the document provides a detailed overview of the research methodology. It includes a description of the study design, the selection of participants, and the procedures used for data collection and analysis. The results section presents the findings of the study, including the main results and any significant differences observed. The discussion section interprets the results in the context of existing literature and discusses the implications of the findings. The conclusion summarizes the key points of the study and provides recommendations for future research.

The third section of the document discusses the results of the study. It presents the main findings and any significant differences observed. The discussion section interprets the results in the context of existing literature and discusses the implications of the findings. The conclusion summarizes the key points of the study and provides recommendations for future research.

The fourth section of the document provides a detailed overview of the research methodology. It includes a description of the study design, the selection of participants, and the procedures used for data collection and analysis. The results section presents the findings of the study, including the main results and any significant differences observed. The discussion section interprets the results in the context of existing literature and discusses the implications of the findings. The conclusion summarizes the key points of the study and provides recommendations for future research.

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-883535 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Elektrische signalen van zenuwcellen Nieuwe behandelingen Hersenziekten Rat Muis
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

9**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>Het doel van dit project is om bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor hersenziekten.</p> <p>De cellen in het zenuwstelsel communiceren met elkaar door middel van elektrische signalen. In dit project wordt elektrofysiologie gebruikt, een techniek die deze signalen kan meten. Weefsels of cellen verkregen vanuit rat of muis worden buiten het dier in leven gehouden. Vervolgens kunnen de elektrische signalen gemeten worden en kunnen er nieuwe kandidaatmedicijnen aan de cellen worden toegediend, waarna de effecten daarvan gemeten kunnen worden. Op basis van de uitkomsten van dit project kunnen nieuwe behandelingen verder ontwikkeld worden en hun werking beter begrepen worden.</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>Een kwart van de mensen krijgt te maken met neurologische ziekten, zoals Alzheimer, Parkinson, depressie of chronische pijn. Een minstens even groot deel van de bevolking zal als mantelzorger betrokken zijn bij een patiënt met een neurologische aandoening. Voor veel van deze ziekten is nog geen, of geen goede, behandeling beschikbaar.</p> <p>Met dit project dragen we bij aan het ontwikkelen van nieuwe behandelingen, door middel van de gespecialiseerde technieken (elektrofysiologie). Kennis verkregen met deze elektrofysiologische technieken zal ervoor zorgen dat veelbelovende nieuwe medicijnen verder ontwikkeld kunnen worden.</p>

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De ratten en muizen worden voornamelijk gebruikt voor het verkrijgen van weefsel en/of cellen. Hiervoor zullen de dieren onder algehele verdoving gedood worden, waarna het benodigde weefsel (bijvoorbeeld de hersenen) verzameld wordt en gebruikt wordt voor de elektrofysiologische experimenten.</p> <p>In sommige gevallen zullen de dieren vooraf een nieuw kandidaatmedicijn toegediend krijgen. Dit kan eenmalig zijn, maar ook vaker. In deze gevallen kunnen ook één of meerdere bloedmonsters afgenomen worden. De duur van iedere handeling is hooguit enkele minuten, bij herhaalde toedieningen van een nieuw medicijn is de totale duur maximaal twee maanden.</p>																						
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Bij de meeste dieren is de enige handeling het onder verdoving doden (om weefsel te kunnen verzamelen).</p> <p>Naar verwachting bij eenderde van de dieren wordt er, voorafgaand aan het verzamelen van weefsel, een nieuw kandidaatmedicijn gegeven. Deze toediening zal eenmalig of meerdere keren zijn, afhankelijk van het te testen medicijn en het geplande gebruik voor patiënten. Om het te testen medicijn toe te dienen worden de dieren kort vastgehouden en meestal wordt het medicijn met behulp van een injectienaald gegeven. Net als bij mensen veroorzaakt dit een kort prikje en kunnen de dieren dit kort onaangenaam vinden.</p>																						
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>300</td> <td>0</td> <td>270</td> <td>30</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</td> <td>300</td> <td>0</td> <td>270</td> <td>30</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	300	0	270	30	0	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	300	0	270	30	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad																			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig																		
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	300	0	270	30	0																		
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	300	0	270	30	0																		
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd															
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																						
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd																				
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden onder algehele verdoving gedood om het weefsel te verzamelen.</p>																						

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Cellen in het zenuwstelsel zijn complex door de vele verbindingen die ze kunnen maken en de manier waarop ze elektrische signalen afgeven, doorgeven of remmen. Deze complexiteit kan momenteel niet bestudeerd worden door middel van niet-biologische modellen. Computermodellen voor deze specifieke cellen zijn nog heel beperkt en kunnen niet de vragen beantwoorden die wij hebben. Voor een goede bepaling van hoe elektrische signalen worden doorgegeven en hoe dit beïnvloed wordt door nieuwe medicijnen zijn levende cellen en/of weefsels nodig. Deze worden verkregen van dieren, waarbij ex vivo elektrofysiologie in weefsel of cellen voor een deel elektrofysiologische metingen in een levend dier kan vervangen.</p>
<p>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.</p>	<p>Bij ex vivo elektrofysiologie worden meerdere metingen verricht aan het weefsel dat uit één dier verkregen wordt. Het weefsel, bijvoorbeeld hersenen, wordt in dunne plakjes gesneden, waarna elk plakje gebruikt kan worden voor de elektrofysiologische experimenten. Cellen worden verzameld en uitgezaaid op microscoopglasjes, ieder glasje kan gebruikt worden voor metingen. Daarbij worden er in de meeste gevallen meerdere elektrofysiologische aspecten bestudeerd binnen één experiment.</p>
<p>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.</p>	<p>Ex vivo elektrofysiologie op weefsels of cellen wordt gezien als een verfijning ten opzichte van in vivo elektrofysiologie in het levende dier. Door alleen met het weefsel te werken, ondervindt het dier geen ongerief behalve het ongerief door eventuele toedieningen van de te testen medicijnen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Muizen en ratten worden gebruikt, de werking van hun hersenen is vergelijkbaar met die van mensen. Voor het verzamelen van cellen worden vaak pasgeboren dieren gebruikt, omdat de cellen van zulke jonge dieren beter buiten het dier blijven groeien. Voor het meten in weefsel, bijvoorbeeld hersenen, worden voornamelijk (jong-)volwassen dieren gebruikt, omdat de elektrische verbindingen tussen de cellen beter ontwikkeld zijn en nog meer overeenkomen met de menselijke hersenen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Contactpersoon

B. J. BOUT

info@zbo-ccd.nl

Referentie

Datum 2 juli 2021

Betreft Advies Secretariaat over vergunningaanvraag AVD202114906

1 -Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Punten van beoordeling	
Instelling	B.1 lid2h
Naam onderzoeker	B.1 lid2a
Titel project	Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.
Categorie van project Benoemen	Omzettingsgericht en toegepast onderzoek
Proces Benoemen: -Bijzonderheden proces -Contact met DEC -Contact met aanvrager	Tijdens verwerken van deze aanvraag, verdween deze aanvraag uit MAUS. Om deze reden is een handmatig advies aangemaakt. Er zijn geen nadere vragen gesteld aan de aanvrager dan wel de DEC.
Diersoorten Benoemen: -Soort/Stam/Geslacht Benadrukken: -Niet-menselijke primaten -Bedreigde diersoorten	300 ratten 300 muizen Vroeg postnataal tot 18 maanden Geslachten (citaat): In most cases, males will be used to ensure the set up matches to other studies by the sponsor. However, males and females may be used if tissue is collected from postnatal animals and if gender is not a relevant factor for the research question. During the development of the study plan, the gender of the animals is considered with the sponsor and the scientific importance of using both genders for evaluation of effects of new potential medication is emphasized.
Benoemen: Herkomst dieren	Gefokt voor gebruik in dierproeven

Locatie uitvoering experimenten Benoemen: -Binnen/buiten instelling vergunninghouder? -Eerdere problemen met vergunninghouder?	De experimenten worden uitgevoerd in een instelling die bekend is bij de NVWA. Er zijn geen eerdere problemen bekend met deze vergunninghouder.
Maatschappij Benoemen:	5.2 lid1

2 -DEC advies

Punten van beoordeling	
DEC-advies Benoemen: -Samenvatting belangrijkste punten uit DEC-advies -Door DEC opgevraagde informatie -Ethische afweging -Eindoordeel Benadrukken: -Knelpunten uit het advies en gestelde vragen door DEC - Negatief luidend advies	<p>De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over o.a. de criteria waarop besloten wordt op een klantvraag in te gaan, verheldering wanneer in vitro of in vivo blootstelling plaats zal vinden, uitleesparameters, verheldering belangen proefdieren nu en in de toekomst, mogelijkheden gebruik organoïden, verheldering dat alleen wildtype/naieve dieren gebruikt worden, leeftijd dieren met eventueel bijkomend ongerief, bijeffecten onbekende compounds, mogelijk bereiken ernstig ongerief, mogelijkheid hergebruik.</p> <p>Citaat C11 (ongerief) 70% van de dieren zal onder anesthesie (terminaal) worden gedood om biologisch materiaal uit te nemen voor verder ex-vivo onderzoek. Omdat het om hersenmateriaal gaat waarvan de electrofysiologie post-mortem behouden moet blijven, is snelheid een voorwaarde. Daarom kan het materiaal niet worden afgenomen na euthanasie. Omdat de dieren onder anesthesie worden gebracht, zijn zij ingeschat op mild ongerief. De categorie mild ongerief is aangevuld met nog 20% van de dieren tot 90%, omdat de overige dieren gebruikt zullen worden voor de evaluatie van potentiële farmaca, waarvoor o.a. het toedienen van het farmacon en het afnemen van bloed noodzakelijk is. Deze 10% zal hierdoor matig ongerief ondergaan, vanwege de veelheid aan handelingen. De DEC heeft met de vragen 5 en 6 doorgevraagd naar het ongerief om over de oudere dieren en eventuele bij-effecten van stoffen bij diverse dieren meer duidelijkheid te krijgen. De vragen zijn helder beantwoord en de DEC staat achter deze inschatting.</p> <p>Citaat C18 (geslachten): Daar waar dit kan zal voor het verzamelen van biologisch materiaal gebruik worden gemaakt van beide geslachten. Een deel van het onderzoek zal alleen in mannetjes worden uitgevoerd om aan te sluiten bij eerder uitgevoerd onderzoek.</p> <p>Ethische afweging (Citaat):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Rechtvaardigt het doel, namelijk het onderzoek (in opdracht van sponsors) naar het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden die de symptomen van patiënten met aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) lijden kunnen helpen te verlichten, het ongerief van 300 ratten en 300 muizen met (evenredig verdeeld) 90% mild en 10% matig ongerief?

	<p>2. Zowel de instelling als de opdrachtgever aan de instelling hebben een economisch belang en een belang om bij te dragen aan de medische vooruitgang. Deze beide soorten belangen zijn uiteraard met elkaar verweven (economisch belang <i>door</i> bij te dragen aan de wetenschap). De DEC acht dit belang zeer klein in verhouding tot de belangen van patiënten en de proefdieren.</p> <p>De patiënt heeft een groot moreel belang bij het vinden van een goede therapie voor de beschreven aandoeningen, omdat daar vaak nog geen goede therapie voor is. Hoewel niet concreet aantoonbaar is dat er ook therapieën gevonden zullen worden, is de kans redelijk dat er stappen in die richting gemaakt zullen kunnen worden.</p> <p>Ook het belang van de proefdieren weegt zwaar, maar is beperkt wegens het relatief lage aantal proefdieren en het redelijk beperkt blijven van het ongerief en de schending van de integriteit. De DEC is van mening dat vooral het belang van de patiënten hier zwaar weegt, zwaarder dan de andere belangen, gezien de grote medische (en ook wel maatschappelijke) consequenties van de aandoeningen en het gebrek aan goede behandelmethoden.</p> <p>3. Op grond van de argumenten bij 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het gerechtvaardigd is dit onderzoek (in opdracht van sponsors) naar het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden voor aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) te verrichten, waarbij het beperkte ongerief en de inbreuk op de integriteit van de 600 ratten en muizen minder zwaar weegt. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is gerechtvaardigd.</p> <p>De DEC adviseert de vergunning te verlenen.</p> <p>Het advies is in consensus tot stand gekomen.</p>
--	--

3-Kwaliteit DEC advies

Punten van beoordeling	
Kwaliteit DEC-advies Benoemen: -Volledigheid advies -Onafhankelijkheid -Objectiviteit -Consistentie	Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

4 -Inhoudelijke beoordeling

Punten van beoordeling	
Belangenverstremgeling Benoemen: -Waren er medewerkers van het secretariaat met mogelijke belangen en/of arbeidsrelaties die minder dan 5 jaar geleden geëindigd zijn?	Eén van de medewerkers van het Secretariaat heeft een arbeidsrelatie gehad met deze instelling, die minder dan 5 jaar geleden is beëindigd. Deze medewerker is niet betrokken geweest bij de behandeling van deze aanvraag.

<p>-Zo ja, hoe is hier mee omgegaan?</p>	
<p>Doelstelling Benoemen: -Doelstelling Benadrukken: -Wat is het wetenschappelijk belang? -Wat is het maatschappelijk belang?</p>	<p>Citaat Doelstelling: The purpose of this project is the acquisition of translational knowledge about the electrophysiological effects of potential new treatments in relevant regions of the nervous system or other electrically active tissue. Purpose is the study of the efficacy of substances to engage with their target (e.g. receptor or ion channel) and the associated effects on the electrical activity of the cells. Examples of this activity are the cell's capability to fire action potentials (excitability), the synaptic connectivity and modulation of synaptic strength (learning and memory), as well as currents of distinct ion channel types that are targets of pharmacological modulation. Moreover, possible side-effects on the electrophysiological function of individual cells or groups of cells can be assessed (e.g. epileptiform activity or undesired effects on certain ion channels) and characterized as an early indication of the safety profile that would then have to be further evaluated in regulatory safety studies. The acquired information is essential to ensure good translation towards <i>in vivo</i> animal models and ultimately towards clinical evaluation. Finally, the information may also become part of documentation associated with IND-filing (IND = Investigational New Drug) to obtain approval for first-in-human study.</p> <p>Immediate goals The immediate goal of the studies is the postmortem collection of tissue. The tissue will be used to obtain tissue slices or primary cells for direct use or culture with viable cells/neurons. From these cells, measurements of one or several relevant electrophysiological parameters are performed. Advanced methods to record minute electrical signals <i>ex vivo</i> are utilized in conjunction with application of potential new treatments or controls (e.g. specific (ant-)agonists or modulators of ion channels). The complex electrical signals are analyzed with refined methods and meaningful information are extracted for conclusive evaluation of potential new treatment and compounds. Electrophysiological recording performed from such preparations have the advantage over i.e. differentiated stem cells that the synaptic connectome is preserved (tissue slices) and that the ion channel expression closer matches the <i>in vivo</i> situation.</p> <p>Ultimate goals The ultimate goals are to gain a deeper understanding of the functional underpinnings of neuronal conditions and to acquire information about the mechanism by which drug candidates could serve as new treatments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust due to genetic conservation (Jegla et al., 2009).</p> <p>Given that the sponsors request our services and expertise at different development stages of their potential new treatment, detailed immediate and ultimate goals may differ per sponsor and compound. The research question that we are requested to address by the sponsors depends on the existing knowledge about properties of the compound, on the in-house expertise and laboratory options of the sponsor and on which aspects they intend to outsource to us or other S.1.1.1.1 Together with the</p>

sponsor, the researcher designs studies to best answer their research question in the light of the research capabilities at our site and at other sites within **5.1 lid2h** and

Examples of such research questions are:

- Does a potential new treatment change a particular electrophysiological parameter (e.g. ion channel current)?
- What is the dose-response relationship of a potential new treatment on a particular electrophysiological parameter (indicative of a future therapeutic range *in vivo*)?
- Is the effect of a potential new treatment specific to a certain target (e.g. ion channel)?
- Can a pharmacologically evoked *ex vivo* disease phenotype (such as pharmacologically induced epileptic seizures in hippocampal slices (Steidl et al., 2019) be addressed by the experimental substance?
- Is the effect of the investigated new potential treatment superior to effect(s) of existing medications (also in context of side-effects)?
- Are there side-effects of a potential new treatment on electrophysiological parameters?

We aim to continuously develop and optimize the established methods in the light of the latest scientific and methodological progress so as to increase quantity and quality of obtained data and to contribute to increase the success rates in drug development efforts.



Citaat belang: According to the WHO, many millions of people worldwide are affected by a neurological condition – with far-reaching social and economic consequences. In the light of the demographic change it is expected that these numbers and the associated burden will further increase over the next decennia. Despite the fact that several hundreds of potential new treatments are under development at any given time, for years, only about 10-15 new treatments are approved per year (Medicines in Development for Neurological Disorders 2013, 2018).

Many drug candidates fail in late stages of development, often even as late as during clinical phases. This is a situation that leads to enormous delays and exorbitant development costs in order to obtain effective and safe treatments – eventually keeping patients' needs unmet.

It is therefore of utmost importance to characterize new neurological treatments for their potential in early stages of the (pre-clinical) development by reliable translational methods. The methods described in this application are particularly well suited to understand the functional underpinnings of neurological conditions as well as to evaluate drug candidates for their potential to serve as remedies for these conditions. The *ex vivo* approach allows for direct observation and measurement of cells in a preparation that preserves most physiological properties of the cellular function as in the intact animal, while it allows for defined pharmacological conditions and for multiple measurements from the derived tissue and effectively reduces the number of animals used. Moreover, it allows for increased

	throughput in evaluating (screening) compounds for their potential to be advanced further into clinical evaluation.
Wetenschappelijke kwaliteit Benoemen (indien bekend): - kwaliteit onderzoeker en onderzoeksgroep - kwaliteit onderzoek - Beschikbaarheid externe funding	Citaat C7 DEC advies: De aanvragers hebben zeer veel ervaring op dit gebied, zowel wetenschappelijk als voor de benodigde proefopzet en de uitvoering van de beoogde experimenten, hetgeen uit hun gevestigde naam en diverse publicaties blijkt. Het Secretariaat heeft geen redenen te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers of het onderzoek.
3V's	
Vervanging Benoemen: - Zijn er alternatieven overwogen? - Klopt de redenering waarom hier niet voor gekozen is?	Citaat: In most cases, prior to the studies proposed here, experimental compounds have been evaluated in mitotic cell lines or (human) immortalized cell lines that express the relevant receptor(s)/ion channels(s) for a principle understanding of the interaction with their target receptor. However, use of these cell lines forms a highly reductionist approach and does not account for the complexity in connectivity and natural expression state. The methods described in this application allow for a functional understanding in viable neurons and form an important intermediate translational step between early mechanistic insights on the receptor level and <i>in vivo</i> evaluation of effect. Similarly, the study of natural synaptic connectivity from CNS slices currently cannot be substituted by using cell lines. Recent progress in (<i>in silico</i>) modelling of neuronal function may provide a useful initial step in drug development. However, as these models are built under assumptions derived from electrophysiological measurements under controlled conditions, they are naturally insufficient to reveal unknown aspects of mechanisms of action and functional implications of experimental compounds that only can be evaluated in viable neurons/cells. Organoids may be composed of distinct types of neurons that can be found in relevant brain areas. However, the connectivity among these neurons within organoid structures differs substantially from that of "real" brains. So far, organoids may serve as substitute for certain aspects of neuronal cell-physiology but still fall short in mimicking the complexity of originally developed animal brains. <i>Ex vivo</i> brain slices combine access to cells within their natural structure with a great reduction of discomfort to the animals – a combination that to our knowledge currently cannot be achieved with other (potential) substitute techniques.
Vermindering Benoemen:	Citaat: The herein described procedures allow for obtaining multiple CNS slices or primary cell culture from a single animal. Maintaining viability of the cells within the slice or in culture

<p>-Hoe wordt er voor gezorgd dat zo min mogelijk dieren gebruikt wordt?</p>	<p>enables us to perform multiple measurements from the biological material derived from one animal. Moreover, in most cases it is possible to measure several electrophysiological characteristics (such as resting membrane potential, action potential firing and properties, synaptic connectivity) from one cell, thereby further reducing the required tissue and thus the number of animals. When collecting tissue for the electrophysiological experiments from non-treated animals it is also possible to harvest clean tissue(s) for reference material in bioanalytical studies. A separate license (AVDXXXXX20184846) is in place for collection of this type of tissue but harvesting tissue from animals under this license reduces the number of animals required for the other license.</p>
<p>Verfijning Benoemen: -Hoe wordt het ongerief van de dieren zoveel mogelijk beperkt en het welzijn bevorderd?</p>	<p>Citaat: <i>Ex vivo</i> electrophysiological experiments in themselves are considered a refinement for the advantage that the measurements are performed in tissue / cell culture and the subject animals from which the tissue was obtained do not experience effects of the electrophysiological measurements. Nonetheless, mild to moderate discomfort may arise if animals are pre-treated with experimental compound. Refinement of procedures to alleviate this potential discomfort have been described above for addressing of possible adverse effects. <i>Ex vivo</i> evaluation of experimental compound serves an important gate-keeper function in decision making for advancing compounds to <i>in vivo</i> testing, thereby reducing the risk of unnecessary <i>in vivo</i> tests of non-effective compounds.</p> <p>Citaat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Negative effects associated with the experimental compound will be minimized as follows: <ol style="list-style-type: none"> a) In the context of designing the experiments, detailed information about the experimental compound will be requested from the sponsor. This information may predict potential emergence of discomfort. b) After administration of experimental compound, animals will be monitored for signs of discomfort and adverse effect. Animal welfare will be evaluated utilizing an internal decision-tree. If required and reasonable, special care will be provided. c) If effects emerge that were not foreseeable and/or not described in the decision-tree, in conjunction with the IvD and the veterinarian, measures will be evaluated to relieve the discomfort or, if required, to terminate the animals. d) In most cases, one animal or a small group of animals will be subjected to tissue collection for the electrophysiology procedures. Therefore, emergence of adverse effects will likely show in first animal(s) taken into experiment. Hereby we can ensure that experimental compound related adverse effects can be addressed early and appropriate measures be taken. 2) The relevance/necessity of using older animals will be discussed in detail with the sponsor. Close monitoring of the animals will ensure that emergence of discomfort can be recognized early and special care accounting for the specific

	requirements can be given. The emergence of tumors will be regarded as a humane endpoint.
Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, benoemen: -Is er sprake van herhaling?	Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek
Hergebruik Benomen	Er is geen sprake van hergebruik.
Mate van ongerief Benomen: -Indeling mate ongerief -Is deze indeling correct?	90% licht, 10% matig To obtain tissue for the electrophysiological measurements, animals are terminated under general anesthesia (i.e. Isoflurane) without any previous procedures, the severity is therefore classified as mild (70% of animals). If animals are administered experimental compounds, with or without blood sampling before termination, the experiments are considered to cause mild (20% of animals) to moderate (10% of animals) discomfort depending on the frequency of the performed procedures.
Lot van de dieren	
Humane eindpunten Benomen: -Zijn humane eindpunten noodzakelijk? -Zijn deze goed gedefinieerd? -Percentage dieren?	Criteria: In cases where animals are pre-treated, circumstances requiring humane endpoint implementation may arise with low likelihood. Criteria for humane endpoints are described in the  Internal SOP <i>Animal discomfort and humane endpoints</i> and include parameters such as weight (in general weight-loss of more than 15% in short time), the emergence of tumors, fur condition, eye coloration, skin coloration, body temperature, mobility, and alertness. Kans op bereiken humaan eindpunt: <1%
Doden van dieren Benomen -Worden dieren in het kader van de proef of na afloop van de proef gedood? -Is dit noodzakelijk volgens de aanvrager?	De dieren worden gedood voor verzamelen van weefsel.
Methode doden Worden dieren gedood volgens de voor de betreffende diersoort vastgestelde richtlijnen? Zo niet, benoem: -Is dit goed onderbouwd? -Is dit noodzakelijk? -Wordt het lijden van de dieren zo veel mogelijk beperkt?	 2

Overzicht van opmerkingen bij 14. AVD202114906b_Adviesnota CCD - [redacted] df

Pagina: 8

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Datum: 2-7-2021 13:14:00
5.2 lid1 [redacted]

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Datum: 2-7-2021 13:17:00
In de bijlage ze dat alle dieren onder diepe anesthesie zullen worden gedecapiteerd. 5.2 lid1 [redacted]

5. Samenvatting

Deze aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de strategie, de 3V's en de humane eindpunten om tot een besluit te komen. Het DEC advies kan hieraan ten grondslag liggen.

Deze aanvraag is een vervolg van vergunning AVD2015534, waarbij de aanvrager jaarlijks heeft teruggekoppeld welk type teststof getest is en voor welke ziektebeelden experimenten zijn uitgevoerd (voorwaarde).

Het betreft wederom een aanvraag die voor -doeleinden wordt ingezet.

Het Secretariaat is van mening dat 5.2 lid 1

[Redacted]

In de vorige vergunning zijn tot nu toe ongeveer 200 dieren gebruikt. In onderliggende aanvraag worden 600 dieren aangevraagd. De aanvrager heeft het aantal dieren per experiment onderbouwd, en doet een schatting van het aantal experimenten dat zal worden uitgevoerd. Gezien het 5.2 lid 1

[Redacted]

In antwoord op een vraag van de DEC geeft de aanvrager aan dat ernstig ongerief niet verwacht wordt, maar niet 100% is uit te sluiten. Dit zal echter enkel een uitzonderlijk geval betreffen, en beoordeling achteraf is daarom niet geïndiceerd.

5.2 lid 1

[Redacted]

. Het percentage dieren dat een humaan eindpunt bereikt is <1%, en de dieren zullen worden gedood voordat ernstig ongerief plaatsvindt.

De aanvrager geeft aan beide geslachten te kunnen inzetten, maar soms enkel mannelijke dieren toe te passen, wanneer dit nodig is voor vergelijkbaarheid/toevoeging aan eerder onderzoek bij de klant dat in mannelijke dieren is uitgevoerd. 5.2 lid 1

[Redacted]

6 -Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning en eventuele voorwaarden

Het Secretariaat stelt voor 5.2 lid 1

[Redacted]

Pagina: 9

Nummer: 1 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 2-7-2021 13:19:00
Nummer: 2 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 2-7-2021 14:15:00
Nummer: 3 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 2-7-2021 13:21:00
Nummer: 4 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 1-7-2021 16:56:00
Nummer: 5 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 2-7-2021 14:12:00
Nummer: 6 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 1-7-2021 17:03:00
Nummer: 7 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 2-7-2021 14:13:00
Nummer: 8 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 1-7-2021 17:07:00



Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Contactpersoon
5.1 lid2e

info@zbo-ccd.nl

Referentie
-

Datum 2 juli 2021

Betreft Advies Secretariaat over vergunningaanvraag AVD202114906

1 -Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Punten van beoordeling	
Instelling	5.1 lid2h
Naam onderzoeker	5.1 lid2e
Titel project	Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.
Categorie van project Benoemen	Omzettingsgericht en toegepast onderzoek
Proces Benoemen: -Bijzonderheden proces -Contact met DEC -Contact met aanvrager	Tijdens verwerken van deze aanvraag, verdween deze aanvraag uit MAUS. Om deze reden is een handmatig advies aangemaakt. De volgende vraag is gesteld aan de aanvrager: - Bij de beschrijving van de humane eindpunten verwijst u naar een SOP. Deze toewijzing geeft ons (CCD) onvoldoende informatie over de humane eindpunten die u toepast. U wordt verzocht de humane eindpunten te verhelderen en te concretiseren zodat deze leesbaar is zonder inzage in de SOP.
Diersoorten Benoemen: -Soort/Stam/Geslacht Benadrukken: -Niet-menselijke primaten -Bedreigde diersoorten	300 ratten 300 muizen Vroeg postnataal tot 18 maanden Geslachten (citaat): In most cases, males will be used to ensure the set up matches to other studies by the sponsor. However, males and females may be used if tissue is collected from postnatal animals and if gender is not a relevant factor for the research question. During the development of the study plan, the gender of the animals is considered with the sponsor and the scientific importance of using both genders for evaluation of effects of new potential medication is emphasized.

Benoemen: Herkomst dieren	Gefokt voor gebruik in dierproeven

Locatie uitvoering experimenten Benoemen: -Binnen/buiten instelling vergunninghouder? -Eerdere problemen met vergunninghouder?	De experimenten worden uitgevoerd in een instelling die bekend is bij de NVWA. Er zijn geen eerdere problemen bekend met deze vergunninghouder.
Maatschappij Benoemen:	5.2 lid 1

2 -DEC advies

Punten van beoordeling	
DEC-advies Benoemen: -Samenvatting belangrijkste punten uit DEC-advies -Door DEC opgevraagde informatie -Ethische afweging -Eindoordeel Benadrukken: -Knelpunten uit het advies en gestelde vragen door DEC - Negatief luidend advies	<p>De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over o.a. de criteria waarop besloten wordt op een klantvraag in te gaan, verheldering wanneer in vitro of in vivo blootstelling plaats zal vinden, uitleesparameters, verheldering belangen proefdieren nu en in de toekomst, mogelijkheden gebruik organoïden, verheldering dat alleen wildtype/naieve dieren gebruikt worden, leeftijd dieren met eventueel bijkomend ongerief, bijeffecten onbekende compounds, mogelijk bereiken ernstig ongerief, mogelijkheid hergebruik.</p> <p>Citaat C11 (ongerief) 70% van de dieren zal onder anesthesie (terminaal) worden gedood om biologisch materiaal uit te nemen voor verder ex-vivo onderzoek. Omdat het om hersenmateriaal gaat waarvan de electrofysiologie post-mortem behouden moet blijven, is snelheid een voorwaarde. Daarom kan het materiaal niet worden afgenomen na euthanasie. Omdat de dieren onder anesthesie worden gebracht, zijn zij ingeschat op mild ongerief. De categorie mild ongerief is aangevuld met nog 20% van de dieren tot 90%, omdat de overige dieren gebruikt zullen worden voor de evaluatie van potentiële farmaca, waarvoor o.a. het toedienen van het farmacon en het afnemen van bloed noodzakelijk is. Deze 10% zal hierdoor matig ongerief ondergaan, vanwege de veelheid aan handelingen. De DEC heeft met de vragen 5 en 6 doorgevraagd naar het ongerief om over de oudere dieren en eventuele bij-effecten van stoffen bij diverse dieren meer duidelijkheid te krijgen. De vragen zijn helder beantwoord en de DEC staat achter deze inschatting.</p> <p>Citaat C18 (geslachten): Daar waar dit kan zal voor het verzamelen van biologisch materiaal gebruik worden gemaakt van beide geslachten. Een deel van het onderzoek zal alleen in mannetjes worden uitgevoerd om aan te sluiten bij eerder uitgevoerd onderzoek.</p> <p>Ethische afweging (Citaat): 1. Rechtvaardigt het doel, namelijk het onderzoek (in opdracht</p>

	<p>van sponsors) naar het ontwikkelen van nieuwe behandelmethode(n) die de symptomen van patiënten met aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) lijden kunnen helpen te verlichten, het ongerief van 300 ratten en 300 muizen met (evenredig verdeeld) 90% mild en 10% matig ongerief?</p> <p>2. Zowel de instelling als de opdrachtgever aan de instelling hebben een economisch belang en een belang om bij te dragen aan de medische vooruitgang. Deze beide soorten belangen zijn uiteraard met elkaar verweven (economisch belang <i>door</i> bij te dragen aan de wetenschap). De DEC acht dit belang zeer klein in verhouding tot de belangen van patiënten en de proefdieren. De patiënt heeft een groot moreel belang bij het vinden van een goede therapie voor de beschreven aandoeningen, omdat daar vaak nog geen goede therapie voor is. Hoewel niet concreet aantoonbaar is dat er ook therapieën gevonden zullen worden, is de kans redelijk dat er stappen in die richting gemaakt zullen kunnen worden. Ook het belang van de proefdieren weegt zwaar, maar is beperkt wegens het relatief lage aantal proefdieren en het redelijk beperkt blijven van het ongerief en de schending van de integriteit. De DEC is van mening dat vooral het belang van de patiënten hier zwaar weegt, zwaarder dan de andere belangen, gezien de grote medische (en ook wel maatschappelijke) consequenties van de aandoeningen en het gebrek aan goede behandelmethode(n).</p> <p>3. Op grond van de argumenten bij 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het gerechtvaardigd is dit onderzoek (in opdracht van sponsors) naar het ontwikkelen van nieuwe behandelmethode(n) voor aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (neurologisch en of psychiatrisch) te verrichten, waarbij het beperkte ongerief en de inbreuk op de integriteit van de 600 ratten en muizen minder zwaar weegt. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is gerechtvaardigd.</p> <p>De DEC adviseert de vergunning te verlenen.</p> <p>Het advies is in consensus tot stand gekomen.</p>
--	--

3-Kwaliteit DEC advies

Punten van beoordeling	
Kwaliteit DEC-advies Benoemen: -Volledigheid advies -Onafhankelijkheid -Objectiviteit -Consistentie	Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

4 -Inhoudelijke beoordeling

Punten van beoordeling	
Belangenverstremeling Benoemen: -Waren er medewerkers van het secretariaat met	Eén van de medewerkers van het Secretariaat heeft een arbeidsrelatie gehad met deze instelling, die minder dan 5 jaar geleden is beëindigd. Deze medewerker is niet betrokken geweest bij de behandeling van deze aanvraag.

<p>mogelijke belangen en/of arbeidsrelaties die minder dan 5 jaar geleden geëindigd zijn? -Zo ja, hoe is hier mee omgegaan?</p>	
<p>Doelstelling Benoemen: -Doelstelling Benadrukken: -Wat is het wetenschappelijk belang? -Wat is het maatschappelijk belang?</p>	<p>Citaat Doelstelling: The purpose of this project is the acquisition of translational knowledge about the electrophysiological effects of potential new treatments in relevant regions of the nervous system or other electrically active tissue. Purpose is the study of the efficacy of substances to engage with their target (e.g. receptor or ion channel) and the associated effects on the electrical activity of the cells. Examples of this activity are the cell's capability to fire action potentials (excitability), the synaptic connectivity and modulation of synaptic strength (learning and memory), as well as currents of distinct ion channel types that are targets of pharmacological modulation. Moreover, possible side-effects on the electrophysiological function of individual cells or groups of cells can be assessed (e.g. epileptiform activity or undesired effects on certain ion channels) and characterized as an early indication of the safety profile that would then have to be further evaluated in regulatory safety studies. The acquired information is essential to ensure good translation towards <i>in vivo</i> animal models and ultimately towards clinical evaluation. Finally, the information may also become part of documentation associated with IND-filing (IND = Investigational New Drug) to obtain approval for first-in-human study.</p> <p>Immediate goals The immediate goal of the studies is the postmortem collection of tissue. The tissue will be used to obtain tissue slices or primary cells for direct use or culture with viable cells/neurons. From these cells, measurements of one or several relevant electrophysiological parameters are performed. Advanced methods to record minute electrical signals <i>ex vivo</i> are utilized in conjunction with application of potential new treatments or controls (e.g. specific (ant-)agonists or modulators of ion channels). The complex electrical signals are analyzed with refined methods and meaningful information are extracted for conclusive evaluation of potential new treatment and compounds. Electrophysiological recording performed from such preparations have the advantage over i.e. differentiated stem cells that the synaptic connectome is preserved (tissue slices) and that the ion channel expression closer matches the <i>in vivo</i> situation.</p> <p>Ultimate goals The ultimate goals are to gain a deeper understanding of the functional underpinnings of neuronal conditions and to acquire information about the mechanism by which drug candidates could serve as new treatments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust due to genetic conservation (Jegla et al., 2009).</p> <p>Given that the sponsors request our services and expertise at different development stages of their potential new treatment, detailed immediate and ultimate goals may differ per sponsor and compound. The research question that we are requested to</p>

address by the sponsors depends on the existing knowledge about properties of the compound, on the in-house expertise and laboratory options of the sponsor and on which aspects they intend to outsource to us or other **5.1 lid2h** Together with the sponsor, the researcher designs studies to best answer their research question in the light of the research expertise and capabilities at our site and at other sites within **5.1 lid2h**

Examples of such research questions are:

- Does a potential new treatment change a particular electrophysiological parameter (e.g. ion channel current)?
- What is the dose-response relationship of a potential new treatment on a particular electrophysiological parameter (indicative of a future therapeutic range *in vivo*)?
- Is the effect of a potential new treatment specific to a certain target (e.g. ion channel)?
- Can a pharmacologically evoked *ex vivo* disease phenotype (such as pharmacologically induced epileptic seizures in hippocampal slices (Steidl et al., 2019) be addressed by the experimental substance?
- Is the effect of the investigated new potential treatment superior to effect(s) of existing medications (also in context of side-effects)?
- Are there side-effects of a potential new treatment on electrophysiological parameters?

We aim to continuously develop and optimize the established methods in the light of the latest scientific and methodological progress so as to increase quantity and quality of obtained data and to contribute to increase the success rates in drug development efforts.

Citaat belang: According to the WHO, many millions of people worldwide are affected by a neurological condition – with far-reaching social and economic consequences. In the light of the demographic change it is expected that these numbers and the associated burden will further increase over the next decennia. Despite the fact that several hundreds of potential new treatments are under development at any given time, for years, only about 10-15 new treatments are approved per year (Medicines in Development for Neurological Disorders 2013, 2018).

Many drug candidates fail in late stages of development, often even as late as during clinical phases. This is a situation that leads to enormous delays and exorbitant development costs in order to obtain effective and safe treatments – eventually keeping patients' needs unmet.

It is therefore of utmost importance to characterize new neurological treatments for their potential in early stages of the (pre-clinical) development by reliable translational methods. The methods described in this application are particularly well suited to understand the functional underpinnings of neurological conditions as well as to evaluate drug candidates for their potential to serve as remedies for these conditions. The *ex vivo* approach allows for direct observation and measurement of cells in a preparation that preserves most physiological properties of the cellular function as in the intact animal, while it allows for

	<p>defined pharmacological conditions and for multiple measurements from the derived tissue and effectively reduces the number of animals used. Moreover, it allows for increased throughput in evaluating (screening) compounds for their potential to be advanced further into clinical evaluation.</p>
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Benoemen (indien bekend): -kwaliteit onderzoeker en onderzoeksgroep -kwaliteit onderzoek -Beschikbaarheid externe funding</p>	<p>Citaat C7 DEC advies: De aanvragers hebben zeer veel ervaring op dit gebied, zowel wetenschappelijk als voor de benodigde proefopzet en de uitvoering van de beoogde experimenten, hetgeen uit hun gevestigde naam en diverse publicaties blijkt.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen redenen te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers of het onderzoek.</p>
<p>3V's</p>	
<p>Vervanging Benoemen: -Zijn er alternatieven overwogen? - Klopt de redenering waarom hier niet voor gekozen is?</p>	<p>Citaat: In most cases, prior to the studies proposed here, experimental compounds have been evaluated in mitotic cell lines or (human) immortalized cell lines that express the relevant receptor(s)/ion channels(s) for a principle understanding of the interaction with their target receptor.</p> <p>However, use of these cell lines forms a highly reductionist approach and does not account for the complexity in connectivity and natural expression state. The methods described in this application allow for a functional understanding in viable neurons and form an important intermediate translational step between early mechanistic insights on the receptor level and <i>in vivo</i> evaluation of effect.</p> <p>Similarly, the study of natural synaptic connectivity from CNS slices currently cannot be substituted by using cell lines. Recent progress in (<i>in silico</i>) modelling of neuronal function may provide a useful initial step in drug development. However, as these models are built under assumptions derived from electrophysiological measurements under controlled conditions, they are naturally insufficient to reveal unknown aspects of mechanisms of action and functional implications of experimental compounds that only can be evaluated in viable neurons/cells. Organoids may be composed of distinct types of neurons that can be found in relevant brain areas. However, the connectivity among these neurons within organoid structures differs substantially from that of "real" brains. So far, organoids may serve as substitute for certain aspects of neuronal cell-physiology but still fall short in mimicking the complexity of originally developed animal brains. <i>Ex vivo</i> brain slices combine access to cells within their natural structure with a great reduction of discomfort to the animals – a combination that to our knowledge currently cannot be achieved with other (potential) substitute techniques.</p>
<p>Vermindering Benoemen:</p>	<p>Citaat: The herein described procedures allow for obtaining multiple CNS slices or primary cell culture from a single animal. Maintaining viability of the cells within the slice or in culture</p>

<p>-Hoe wordt er voor gezorgd dat zo min mogelijk dieren gebruikt wordt?</p>	<p>enables us to perform multiple measurements from the biological material derived from one animal. Moreover, in most cases it is possible to measure several electrophysiological characteristics (such as resting membrane potential, action potential firing and properties, synaptic connectivity) from one cell, thereby further reducing the required tissue and thus the number of animals. When collecting tissue for the electrophysiological experiments from non-treated animals it is also possible to harvest clean tissue(s) for reference material in bioanalytical studies. A separate license (AVDXXXXX20184846) is in place for collection of this type of tissue but harvesting tissue from animals under this license reduces the number of animals required for the other license.</p>
<p>Verfijning Benoemen: -Hoe wordt het ongerief van de dieren zoveel mogelijk beperkt en het welzijn bevorderd?</p>	<p>Citaat: <i>Ex vivo</i> electrophysiological experiments in themselves are considered a refinement for the advantage that the measurements are performed in tissue / cell culture and the subject animals from which the tissue was obtained do not experience effects of the electrophysiological measurements. Nonetheless, mild to moderate discomfort may arise if animals are pre-treated with experimental compound. Refinement of procedures to alleviate this potential discomfort have been described above for addressing of possible adverse effects. <i>Ex vivo</i> evaluation of experimental compound serves an important gate-keeper function in decision making for advancing compounds to <i>in vivo</i> testing, thereby reducing the risk of unnecessary <i>in vivo</i> tests of non-effective compounds.</p> <p>Citaat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Negative effects associated with the experimental compound will be minimized as follows: <ol style="list-style-type: none"> a) In the context of designing the experiments, detailed information about the experimental compound will be requested from the sponsor. This information may predict potential emergence of discomfort. b) After administration of experimental compound, animals will be monitored for signs of discomfort and adverse effect. Animal welfare will be evaluated utilizing an internal decision-tree. If required and reasonable, special care will be provided. c) If effects emerge that were not foreseeable and/or not described in the decision-tree, in conjunction with the IvD and the veterinarian, measures will be evaluated to relief the discomfort or, if required, to terminate the animals. d) In most cases, one animal or a small group of animals will be subjected to tissue collection for the electrophysiology procedures. Therefore, emergence of adverse effects will likely show in first animal(s) taken into experiment. Hereby we can ensure that experimental compound related adverse effects can be addressed early and appropriate measures be taken. 2) The relevance/necessity of using older animals will be discussed in detail with the sponsor. Close monitoring of the animals will ensure that emergence of discomfort can be recognized early and special care accounting for the specific

	requirements can be given. The emergence of tumors will be regarded as a humane endpoint.
Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, benoemen: -Is er sprake van herhaling?	Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek
Hergebruik Benomen	Er is geen sprake van hergebruik.
Mate van ongerief Benomen: -Indeling mate ongerief -Is deze indeling correct?	90% licht, 10% matig To obtain tissue for the electrophysiological measurements, animals are terminated under general anesthesia (i.e. isoflurane) without any previous procedures, the severity is therefore classified as mild (70% of animals). If animals are administered experimental compounds, with or without blood sampling before termination, the experiments are considered to cause mild (20% of animals) to moderate (10% of animals) discomfort depending on the frequency of the performed procedures.
Lot van de dieren	
Humane eindpunten Benomen: -Zijn humane eindpunten noodzakelijk? -Zijn deze goed gedefinieerd? -Percentage dieren?	Criteria: In cases where animals are pre-treated, circumstances requiring humane endpoint implementation may arise with low likelihood. Criteria for humane endpoints are described in the internal SOP <i>Animal discomfort and humane endpoints</i> and include parameters such as weight (in general weight-loss of more than 15% in short time), the emergence of tumors, fur condition, eye coloration, skin coloration, body temperature, mobility, and alertness. Kans op bereiken humaan eindpunt: <1%
Doden van dieren Benomen -Worden dieren in het kader van de proef of na afloop van de proef gedood? -Is dit noodzakelijk volgens de aanvrager?	De dieren worden gedood voor verzamelen van weefsel.
Methode doden Worden dieren gedood volgens de voor de betreffende diersoort vastgestelde richtlijnen? Zo niet, benoem: -Is dit goed onderbouwd? -Is dit noodzakelijk? -Wordt het lijden van de dieren zo veel mogelijk beperkt?	Ja. De dieren worden gedood door decapitatie onder diepe anesthesie.


5. Samenvatting

Deze aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de strategie en de 3V's om tot een besluit te komen. Het DEC advies kan hieraan ten grondslag liggen.

Deze aanvraag is een vervolg van vergunning AVD2015534, waarbij de aanvrager jaarlijks heeft teruggekoppeld welk type teststof getest is en voor welke ziektebeelden experimenten zijn uitgevoerd (5.1 lid 2^o voorwaarde).

Het betreft wederom een aanvraag die voor 5.1 lid 2^o doeleinden wordt ingezet.

Het Secretariaat 5.2 lid 1



In de vorige vergunning zijn tot nu toe ongeveer 200 dieren gebruikt. In onderliggende aanvraag worden 600 dieren aangevraagd. De aanvrager heeft het aantal dieren per experiment onderbouwd, en doet een schatting van het aantal experimenten dat zal worden uitgevoerd. Gezien het 5.1 lid 2^o karakter van deze aanvraag is een betere inschatting van het aantal experimenten mogelijk niet te geven, en zal de aanvrager een ruim aantal dieren beschreven hebben.


In antwoord op een vraag van de DEC geeft de aanvrager aan dat ernstig ongerief niet verwacht wordt, maar niet 100% is uit te sluiten. Dit zal echter enkel een uitzonderlijk geval betreffen, en beoordeling achteraf is daarom niet geïndiceerd.

5.2 lid 1



Het percentage dieren dat een humaan eindpunt bereikt is <1%, en de dieren zullen worden gedood voordat ernstig ongerief plaatsvindt. De aanvrager is gevraagd de humane eindpunten nader te concretiseren.

De aanvrager geeft aan beide geslachten te kunnen inzetten, maar soms enkel mannelijke dieren toe te passen, wanneer dit nodig is voor vergelijkbaarheid/toevoeging aan eerder onderzoek bij de klant dat in mannelijke dieren is uitgevoerd. 5.2 lid 1



6 -Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning en eventuele voorwaarden

5.2 lid 1



5.1 lid2e

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 6 juli 2021 11:09
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114906

12

Geachte 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2e,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 mei 2021. Het gaat om uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD 5.1 lid2h 202114906.

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:

- Bij de beschrijving van de humane eindpunten verwijst u naar een SOP. Deze toewijzing geeft ons (CCD) onvoldoende informatie over de humane eindpunten die u toepast. U wordt verzocht de humane eindpunten te verhelderen en te concretiseren zodat deze leesbaar is zonder inzage in de SOP.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Ter informatie: Uw aanvraag wordt besproken in de CCD vergadering van 9 juli.

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 – 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Geachte **5.1 lid2e**

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 mei 2021. Het gaat om uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions ". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD **5.1 lid2e** 02114906. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

Welke informatie nog nodig

Bij de beschrijving van de humane eindpunten verwijst u naar een SOP. Deze toewijzing geeft ons (CCD) onvoldoende informatie over de humane eindpunten die u toepast. U wordt verzocht de humane eindpunten te verhelderen en te concretiseren zodat deze leesbaar is zonder inzage in de SOP.

De humane eindpunten voor de dieren die al voor het terminatiemoment in experiment gaan, zijn nu als volgt beschreven:

Criteria for humane endpoints are:

- *weight-loss of more than 15% within 1-2 days*
- *the emergence of tumors*
- *overall poor health condition: combination of several symptoms (loss of body weight, extremely rough and dull looking fur, changed eye coloration, changed skin coloration, body temperature noticeably increased or decreased, lack of mobility and alertness).*

These criteria are described in the internal SOP Animal discomfort and humane endpoints.

Nieuw document:

- Appendix 1 **5.1 lid2h**-2021-14906-20210707.docx



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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Tissue collection from mice and rats for <i>ex vivo</i> electrophysiological measurements

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Experimental approach

The animal experiments are performed in order to collect postmortem tissue for *ex vivo* electrophysiological measurements. In some cases, animals will be subject to pre-treatment with experimental compounds / potential new treatments.

Neurological conditions like neurodegenerative or neuropsychiatric conditions, or (chronic) pain are accompanied by changes in electrical signaling among (neuronal) cells. *Ex vivo* electrophysiology provides an outstanding possibility to study the physiological mechanisms (e.g. by infusion of selective (ant-)agonists or modulators of ion channels) and the effect of potential new treatments on the level of individual cells as well as their local network. The techniques allow for the measurement of minute electrical signals associated with neuronal/cellular information processing and electroactive function.

Ex vivo electrophysiology techniques used at our research facility are manual patch-clamp (MPC) and multi-electrode arrays (MEA).

MPC: This technique builds on direct physical contact of a glass capillary electrode with the subject cell either in tissue slices or cell culture. It is considered the gold-standard for the most comprehensive understanding of the electrical state of a cell – and allows for measurements ranging from action potential and synaptic activity to individual ion channel currents.

MEA: This technique makes use of arrays of metal electrodes that pick up extracellular signal of neuronal activity. It is particularly suited for the examination of populations of neurons for their spontaneous activity, for mechanisms of synaptic plasticity (associated with learning and memory, processes impaired in many neurodegenerative conditions e.g. Alzheimer's disease) and for synchrony of electrical activity (e.g. epilepsy).

Primary outcome parameters

Primary outcome parameter of the animal study is the obtained tissue which will then be used to generate tissue slices or primary cell culture.

Secondary outcome parameters

Secondary outcome parameters are associated with measurements of the electrophysiological state of the neurons/cells (within tissue slices or from tissue based primary cell culture) and include but are not restricted to:

- 1) General electrophysiological properties (i.e. resting membrane potential, membrane resistance, and membrane capacitance)
- 2) Properties of spontaneous or stimulated action potentials (i.e. frequency and amplitude)
- 3) Properties of spontaneous or stimulated synaptic potentials and currents (i.e. frequency and amplitude)
- 4) Transmembrane currents originating from ion channels (identified by distinct activation protocols and specific pharmacological isolation)
- 5) Population (synaptic) activity of groups of neurons (e.g. associated with learning and memory, or epilepsy)

The set of parameters assessed in a particular study is determined by the research question and the proposed mechanism by which the experimental compounds are expected to act on the cells. These parameters are standard parameters for the MPC or the MEA techniques.

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

Animals are received at the vivarium and kept in open or individually ventilated (IVC) cages (according to directive EU 2010/63).

Depending on the experimental design it may be required to treat the animals before termination (under general anesthesia). Individual animals may be dosed once or several times (maximum 60 times in total, e.g. 2 months daily, or 1 month twice daily) with test compound(s) (experimental and/or reference compound or vehicle).

Possible routes of administration are among others:

- subcutaneous
- intraperitoneal
- oral (per gavage or as part of the diet)
- rectal
- intranasal
- intravenous
- intramuscular

To determine concentrations of test compound, blood samples may be collected terminally or during (chronic) dosing (via cheek-vein puncture for mice or tail-vein puncture for rats). In the case that blood samples are collected during the *in vivo* phase, this will be up to a maximum of 10% of the blood volume taken within up to 1 week. After the animal is anesthetized and subsequently terminated according to annex IV of directive EU 2010/63, central nervous system (CNS), peripheral nervous system (PNS) or other electrically active tissue will be collected. The tissue will be extracted from the animal as fast as possible and processed further. Additionally, further tissue could be collected to, for example, determine the test compound levels.

Tissue processing for *ex vivo* electrophysiology can be:

- Generation of tissue slices utilizing a precision cutting apparatus (i.e. a vibratome)
- Isolation of individual cells, creating a primary culture, by means of chemical and mechanical dissociation

Electrophysiology may be performed directly after tissue processing or after further culturing for prolonged time in suitable conditions.

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

The number of required animals for a given study is primarily determined by the expected number of successful measurements per collected tissue from one animal, and by the number of measurements required for statistical robustness. To determine the required number of measurements/animals - statistical power-analysis is used (online available software G*Power: <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower.html>)

The expected number of successful measurements per collected tissue depends on:

- whether the study question can be best answered by using tissue slices or primary cell culture
- the time required for the individual measurements in context of *ex vivo* survival of the tissue slices or primary cells.
- the number of relevant tissue slices or cells that can be obtained from one animal

The number of required measurement repetitions primarily depends on the expected intrinsic variance of the electrophysiological parameters of the different cell/receptor (sub-)types. If an experimental compound is tested, the variance in response, number of different concentrations and relevant controls will also determine the number of required animals.

Typical group sizes are 5 animals. From each animal, it allows for the generation of several brain slices (i.e. 3-4 brain slices from hippocampus), or to obtain primary cells (i.e. $2-5 \cdot 10^5$ cells from dorsal root ganglia) which are seeded on multiple coverslips. *Ex vivo* brain slices can be kept viable for 6-8 hours depending on several factors such as the brain region and the age of the animal. Cell culture from cells obtained from *ex vivo* tissue can be maintained for days to weeks depending on the cell types and the brain region of origin. Each individual slice or coverslip can be used for one or several measurements – thereby substantially reducing the number of required animals. If the experimental design allows, repeated measurements from the same cells are performed to increase statistical power (i.e. cells exposed to several subsequent pharmacological conditions including vehicle control). Furthermore, subsequent analysis of the data after each animal allows us to determine if sufficient data has been collected or if additional animals may be used.

B. The animals

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

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mouse	1) animals bred for use in procedures	Early postnatal up to adult/aged	300	Male and female	No	
2	Rat			300			

Provide justifications for these choices

Species	Mice and rats will be used for the experiments. The similarities of neuronal function between humans and rodents are huge and, in most cases, functional translation of effects (e.g. on ion channel currents) is robust. They are also the species most often used for other studies by the sponsor, therefore their use ensures the comparability to those other studies.
Origin	All animals will be sourced from certified breeders.
Life stages	Depending on the study requirements, young up to adult animals (up to an age of 18 months) will be used for tissue collection. For primary cell culture, we would mostly use early postnatal animals.

Number	The numbers are considered the expected maximum to be used and may be less. Within the last 5 years studies on average consisted of 4 groups with 5 animals per group. We expect to perform a maximum of 15 studies on each species.
Gender	In most cases, males will be used to ensure the set up matches to other studies by the sponsor. However, males and females may be used if tissue is collected from postnatal animals and if gender is not a relevant factor for the research question. During the development of the study plan, the gender of the animals is considered with the sponsor and the scientific importance of using both genders for evaluation of effects of new potential medication is emphasized.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Predominantly C57Bl/6 mice and Sprague Dawley or Wistar rats will be used. Depending on the research question, sponsors may require us to use other standard strains.

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

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.

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

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

- 1) Before obtaining tissue post-mortem, animals may be acutely or (sub-)chronically administered experimental compound. Despite prior (*in vitro* and/or *in vivo*) testing, these compounds may cause unknown adverse effects.
- 2) If older animals are used, it is also important to consider age-specific compromises on welfare (for example (but not exclusive to) the formation of ulcers in older animals).

Explain why these effects may emerge.

- 1) The experimental compounds are often not fully characterized for their possible spectrum of adverse effects and may have not yet been (further) tested in animals. Therefore, it may be possible that unexpected adverse effects may emerge that may be observed for the first time. If a compound would show adverse effects exceeding moderate discomfort, relieving treatment is considered or animals will be euthanized as soon as possible.
- 2) If older animals are used, specific discomfort is mostly associated with aging as it would be experienced by elderly humans.

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

- 1) Negative effects associated with the experimental compound will be minimized as follows:
- In the context of designing the experiments, detailed information about the experimental compound will be requested from the sponsor. This information may predict potential emergence of discomfort.
 - After administration of experimental compound, animals will be monitored for signs of discomfort and adverse effect. Animal welfare will be evaluated utilizing an internal decision-tree. If required and reasonable, special care will be provided.
 - If effects emerge that were not foreseeable and/or not described in the decision-tree, in conjunction with the IvD and the veterinarian, measures will be evaluated to relieve the discomfort or, if required, to terminate the animals.
 - In most cases, one animal or a small group of animals will be subjected to tissue collection for the electrophysiology procedures. Therefore, emergence of adverse effects will likely show in first animal(s) taken into experiment. Hereby we can ensure that experimental compound related adverse effects can be addressed early and appropriate measures be taken.
- 2) The relevance/necessity of using older animals will be discussed in detail with the sponsor. Close monitoring of the animals will ensure that emergence of discomfort can be recognized early and special care accounting for the specific requirements can be given. The emergence of tumors will be regarded as a humane endpoint.

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.

Circumstances requiring humane endpoint implementation may arise with low likelihood.

Criteria for humane endpoints are:

- weight-loss of more than 15% within 1-2 days
- the emergence of tumors
- overall poor health condition: combination of several symptoms (loss of body weight, extremely rough and dull looking fur, changed eye coloration, changed skin coloration, body temperature noticeably increased or decreased, lack of mobility and alertness).

These criteria are described in the internal SOP *Animal discomfort and humane endpoints*.

Indicate the likely incidence.

Very low, <1%

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).

To obtain tissue for the electrophysiological measurements, animals are terminated under general anesthesia (i.e. isoflurane) without any previous procedures, the severity is therefore classified as mild (70% of animals). If animals are administered experimental compounds, with or without blood sampling before termination, the experiments are considered to cause mild (20% of animals) to moderate (10% of animals) discomfort depending on the frequency of the performed procedures. For the individual studies, the AWB will assess the cumulative discomfort of the animals based on all procedures performed on an animal.

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>In most cases, prior to the studies proposed here, experimental compounds have been evaluated in mitotic cell lines or (human) immortalized cell lines that express the relevant receptor(s)/ion channels(s) for a principle understanding of the interaction with their target receptor.</p> <p>However, use of these cell lines forms a highly reductionist approach and does not account for the complexity in connectivity and natural expression state. The methods described in this application allow for a functional understanding in viable neurons and form an important intermediate translational step between early mechanistic insights on the receptor level and <i>in vivo</i> evaluation of effect.</p> <p>Similarly, the study of natural synaptic connectivity from CNS slices currently cannot be substituted by using cell lines. Recent progress in (<i>in silico</i>) modelling of neuronal function may provide a useful initial step in drug development. However, as these models are built under assumptions derived from electrophysiological measurements under controlled conditions, they are naturally insufficient to reveal unknown aspects of mechanisms of action and functional implications of experimental compounds that only can be evaluated in viable neurons/cells. Organoids may be composed of distinct types of neurons that can be found in relevant brain areas. However, the connectivity among these neurons within organoid structures differs substantially from that of "real" brains. So far, organoids may serve as substitute for certain aspects of neuronal cell-physiology but still fall short in mimicking the complexity of originally developed animal brains. <i>Ex vivo</i> brain slices combine access to cells within their natural structure with a great reduction of discomfort to the animals – a combination that to our knowledge currently cannot be achieved with other (potential) substitute techniques.</p>
Reduction	<p>The herein described procedures allow for obtaining multiple CNS slices or primary cell culture from a single animal. Maintaining viability of the cells within the slice or in culture enables us to perform multiple measurements from the biological material derived from one animal. Moreover, in most cases it is possible to measure several electrophysiological characteristics (such as resting membrane potential, action potential firing and properties, synaptic connectivity) from one cell, thereby further reducing the required tissue and thus the number of animals.</p> <p>When collecting tissue for the electrophysiological experiments from non-treated animals it is also possible to harvest clean tissue(s) for reference material in bioanalytical studies. A separate license (AVD^{5-11d2f} 20184846) is in place for collection of this type of tissue but harvesting tissue from animals under this license reduces the number of animals required for the other license.</p>
Refinement	<p><i>Ex vivo</i> electrophysiological experiments in themselves are considered a refinement for the advantage that the measurements are performed in tissue / cell culture and the subject animals from which the tissue was obtained do not experience effects of the electrophysiological measurements. Nonetheless, mild to moderate discomfort may arise if animals are pre-treated with experimental compound. Refinement of procedures to alleviate this potential discomfort have been described above for addressing of possible adverse effects.</p> <p><i>Ex vivo</i> evaluation of experimental compound serves an important gate-keeper function in decision making for advancing compounds to <i>in vivo</i> testing, thereby reducing the risk of unnecessary <i>in vivo</i> tests of non-effective compounds.</p>
<p>Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.</p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> No</p>	
<p><input type="checkbox"/> Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.</p>	

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.

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.

Not applicable. No **legally required animal procedures**.

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.

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.

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

The outlined experiments require the collection of tissue from essential organs for electrophysiological measurements that cannot be obtained otherwise. Thus, the animals will be terminated under anesthesia.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Animals will be decapitated under (deep) anesthesia.

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

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

5.1 lid2e

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 12 juli 2021 12:23
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 02114906

15

Geachte 5.1 lid2e,

Dank voor uw antwoorden op de door ons gestelde vragen. De CCD heeft uw aanvraag in de vergadering van 9 juli 2021 besproken en heeft nog de volgende vragen voor u:

Welke informatie nog nodig

- Wij begrijpen dat uw aanvraag een paraplu aanvraag is voor het doen van 5.1 lid2h onderzoek. De CCD zou graag de entrecriteria zien voor de stoffen die u gaat testen. De CCD wil graag zien wat u doet om te borgen dat de stoffen die u gaat testen een toegevoegde waarde hebben voor het onderzoeksveld of de ziektebeelden.
- Onder 3.1 van het projectvoorstel schrijft u dat het onderzoek dat u wilt uitvoeren in dit project gericht is op ziekten van het zenuwstelsel. De CCD ziet graag onder de doelstelling van het project een inkadering van de ziektebeelden waarvoor het onderzoek in dit project wordt toegepast.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 – 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Vragen CCD over 5.1 lid2h 202114906

Wij begrijpen dat uw aanvraag een paraplu aanvraag is voor het doen van 5.1 lid2h onderzoek. De CCD zou graag de entreecriteria zien voor de stoffen die u gaat testen. De CCD wil graag zien wat u doet om te borgen dat de stoffen die u gaat testen een toegevoegde waarde hebben voor het onderzoeksveld of de ziektebeelden.

Aangezien onze klanten in verschillende stadia van ontwikkeling van hun kandidaatstoffen gebruik maken van onze expertise, verschillen de doelen en vraagstellingen per klant en per teststof. Een deel van de stoffen is nieuw ontwikkeld of gericht tegen nieuwe targets, terwijl voor andere teststoffen al meer bekend is en bijvoorbeeld verdere opheldering van het werkingsmechanisme gevraagd is. Deze factoren maken het lastig om algemene entreecriteria voor de teststoffen vast te leggen.

Om voor elke klant en elke teststof de specifieke hypothese te kunnen beantwoorden, ontwerpen we de studie-opzet voor de experimenten altijd in samenspraak met de klant. Hierbij wordt de benodigde beschikbare achtergrondinformatie actief met ons gedeeld en in de studie-opzet verwerkt. Voor elk experiment wordt een afweging gemaakt tussen het te verwachten ongerief voor de dieren en de toegevoegde waarde voor het onderzoeksveld. De experimenten die wij met teststoffen uitvoeren zijn vaak juist onderdeel van een pakket aan experimenten benodigd voor het vaststellen van de toegevoegde waarde van een potentieel geneesmiddel. Vaak gaat het om stoffen die door de klant geselecteerd zijn uit een groep van kandidaatstoffen met behulp van bijvoorbeeld high-throughput screening of andere *in vitro* studies. Het kan echter ook gaan om reeds toegelaten geneesmiddelen waarvoor getest wordt of ze ook voor een nieuwe indicatie toegepast kunnen worden. Een uitkomst van onze studies kan dan bijvoorbeeld zijn dat het target-systeem reageert op de teststof, maar ook dat er geen off-target-effecten zijn. Uit de resultaten van onze experimenten moet dan (mede) blijken of en waarom stoffen geschikt zijn om bepaalde ziektebeelden te behandelen. Deze resultaten geven, samen met de resultaten uit andere uitgevoerde experimenten met deze kandidaatstoffen, onze klanten de informatie om de eigenschappen en effecten van hun kandidaatstoffen te begrijpen en daarmee weloverwogen beslissingen te nemen over de verdere ontwikkelingsstappen voor hun potentiële geneesmiddelen.

Onder 3.1 van het projectvoorstel schrijft u dat het onderzoek dat u wilt uitvoeren in dit project gericht is op ziekten van het zenuwstelsel. De CCD ziet graag onder de doelstelling van het project een inkadering van de ziektebeelden waarvoor het onderzoek in dit project wordt toegepast.

Zoals terecht opgemerkt draagt het onderzoek in het huidige projectvoorstel bij aan de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen verschillende ziekten van het zenuwstelsel. Hoewel wij niet kunnen voorspellen met welke kandidaatstoffen voor welke aandoeningen onze (toekomstige) klanten ons de komende jaren zullen benaderen, hebben we de afgelopen jaren kandidaatstoffen voor onze klanten getest op bijvoorbeeld werkzaamheid en specificiteit, maar soms ook op verslavingspotentieel. Dit waren potentiële geneesmiddelen tegen bijvoorbeeld acute en chronische pijn, ALS, depressie, schizofrenie, epilepsie, multiple sclerose, migraine, ADHD, seksuele disfunctie, motorische stoornissen, zeldzame erfelijke ziekten en de ziekten van Alzheimer, Huntington en Parkinson.

Het in dit projectvoorstel voorgestelde onderzoek is dus niet zozeer ziektebeeld-gebonden als wel methode- en mechanisme-gebonden. Zo zijn sommige effecten op bepaalde ion-kanalen potentieel geschikt voor meerdere medische indicaties. Stoffen die bepaalde kaliumkanalen activeren worden bijvoorbeeld gebruikt in onderzoek tegen chronische pijn maar ook tegen epilepsie.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 19 juli 2021
Betreft Aanvullende adviesnota AVD202114906

Project: Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.

Proces

In de CCD vergadering van 9 juli 2021 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Tijdens de vergadering is besproken dat dit een **5.1 lid 2b** aanvraag betreft, en dat er nog onduidelijkheden waren op het aandeel van de dieren dat in vivo behandeld zou worden, en hoeveel ongerief dit zou opleveren. Daarnaast werd de vraag gesteld aan welke entreecriteria de te testen stoffen voldoen.

Onduidelijkheden

De vraag over het aantal dieren dat in vivo behandeld zou worden, was al in de aanvraag beschreven. Maximaal 30% van de dieren zal in vivo behandeld worden met een teststof, hiervan zal 2/3 deel licht ongerief ondervinden, en maximaal 1/3 deel matig ongerief. Dus van de 600 dieren zullen maximaal 180 dieren in vivo behandeld worden, waarvan maximaal 60 dieren matig ongerief ondervinden.

De volgende vragen zijn nog gesteld aan de aanvrager:

- 1) Wij begrijpen dat uw aanvraag een paraplu aanvraag is voor het doen van **5.1 lid 2b** onderzoek. De CCD zou graag de entreecriteria zien voor de stoffen die u gaat testen. De CCD wil graag zien wat u doet om te borgen dat de stoffen die u gaat testen een toegevoegde waarde hebben voor het onderzoeksveld of de ziektebeelden.
- 2) Onder 3.1 van het projectvoorstel schrijft u dat het onderzoek dat u wilt uitvoeren in dit project gericht is op ziekten van het zenuwstelsel. De CCD ziet graag onder de doelstelling van het project een inkadering van de ziektebeelden waarvoor het onderzoek in dit project wordt toegepast.

Reactie aanvrager

De reactie van de aanvrager op bovenstaande vragen:

Citaat antwoord vraag 1: "Aangezien onze klanten in verschillende stadia van ontwikkeling van hun kandidaatstoffen gebruik maken van onze expertise, verschillen de doelen en vraagstellingen per klant en per teststof. Een deel van de stoffen is nieuw ontwikkeld of gericht tegen nieuwe targets, terwijl voor andere teststoffen al meer bekend is en bijvoorbeeld verdere opheldering van het werkingsmechanisme gevraagd is. Deze factoren maken het lastig om algemene entreecriteria voor de teststoffen vast te leggen.

Om voor elke klant en elke teststof de specifieke hypothese te kunnen beantwoorden, ontwerpen we de studie-opzet voor de experimenten altijd in

samenspraak met de klant. Hierbij wordt de benodigde beschikbare achtergrondinformatie actief met ons gedeeld en in de studie-opzet verwerkt. Voor elk experiment wordt een afweging gemaakt tussen het te verwachten ongerief voor de dieren en de toegevoegde waarde voor het onderzoeksveld. De experimenten die wij met teststoffen uitvoeren zijn vaak juist onderdeel van een pakket aan experimenten benodigd voor het vaststellen van de toegevoegde waarde van een potentieel geneesmiddel. Vaak gaat het om stoffen die door de klant geselecteerd zijn uit een groep van kandidaatstoffen met behulp van bijvoorbeeld high-throughput screening of andere in vitro studies. Het kan echter ook gaan om reeds toegelaten geneesmiddelen waarvoor getest wordt of ze ook voor een nieuwe indicatie toegepast kunnen worden. Een uitkomst van onze studies kan dan bijvoorbeeld zijn dat het target-systeem reageert op de teststof, maar ook dat er geen off-target-effecten zijn. Uit de resultaten van onze experimenten moet dan (mede) blijken of en waarom stoffen geschikt zijn om bepaalde ziektebeelden te behandelen. Deze resultaten geven, samen met de resultaten uit andere uitgevoerde experimenten met deze kandidaatstoffen, onze klanten de informatie om de eigenschappen en effecten van hun kandidaatstoffen te begrijpen en daarmee weloverwogen beslissingen te nemen over de verdere ontwikkelingsstappen voor hun potentiële geneesmiddelen."

Citaat antwoord vraag 2: "Zoals terecht opgemerkt draagt het onderzoek in het huidige projectvoorstel bij aan de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen verschillende ziekten van het zenuwstelsel. Hoewel wij niet kunnen voorspellen met welke kandidaatstoffen voor welke aandoeningen onze (toekomstige) klanten ons de komende jaren zullen benaderen, hebben we de afgelopen jaren kandidaatstoffen voor onze klanten getest op bijvoorbeeld werkzaamheid en specificiteit, maar soms ook op verslavingspotentieel. Dit waren potentiële geneesmiddelen tegen bijvoorbeeld acute en chronische pijn, ALS, depressie, schizofrenie, epilepsie, multiple sclerose, migraine, ADHD, seksuele disfunctie, motorische stoornissen, zeldzame erfelijke ziekten en de ziekten van Alzheimer, Huntington en Parkinson.

Het in dit projectvoorstel voorgestelde onderzoek is dus niet zozeer ziektebeeld-gebonden als wel methode- en mechanisme-gebonden. Zo zijn sommige effecten op bepaalde ion-kanalen potentieel geschikt voor meerdere medische indicaties. Stoffen die bepaalde kaliumkanalen activeren worden bijvoorbeeld gebruikt in onderzoek tegen chronische pijn maar ook tegen epilepsie."

Voorstel Secretariaat

In de oge² van het Secretariaat 5.2 lid 1

Overzicht van opmerkingen bij AVD202114906b_Aanvullende AdviesNotaCCD - [redacted] pdf

Pagina: 2

Nummer: 1 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 21-7-2021 22:52:00
Nummer: 2 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 21-7-2021 23:01:00
Nummer: 3 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Datum: 21-7-2021 22:55:00

[redacted]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 19 juli 2021

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202114906

Project: Ex vivo elektrofysiologie in weefsel en cellen voor het ontwikkelen van potentiële nieuwe behandelingen voor hersenziekten.

Proces

In de CCD vergadering van 9 juli 2021 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Tijdens de vergadering is besproken dat dit een **5.1 lid2f** aanvraag betreft, en dat er nog onduidelijkheden waren op het aandeel van de dieren dat in vivo behandeld zou worden, en hoeveel ongerief dit zou opleveren. Daarnaast werd de vraag gesteld aan welke entreecriteria de te testen stoffen voldoen.

Onduidelijkheden

De vraag over het aantal dieren dat in vivo behandeld zou worden, was al in de aanvraag beschreven. Maximaal 30% van de dieren zal in vivo behandeld worden met een teststof, hiervan zal 2/3 deel licht ongerief ondervinden, en maximaal 1/3 deel matig ongerief. Dus van de 600 dieren zullen maximaal 180 dieren in vivo behandeld worden, waarvan maximaal 60 dieren matig ongerief ondervinden.

De volgende vragen zijn nog gesteld aan de aanvrager:

- 1) Wij begrijpen dat uw aanvraag een paraplu aanvraag is voor het doen van **5.1 lid2h** onderzoek. De CCD zou graag de entreecriteria zien voor de stoffen die u gaat testen. De CCD wil graag zien wat u doet om te borgen dat de stoffen die u gaat testen een toegevoegde waarde hebben voor het onderzoeksveld of de ziektebeelden.
- 2) Onder 3.1 van het projectvoorstel schrijft u dat het onderzoek dat u wilt uitvoeren in dit project gericht is op ziekten van het zenuwstelsel. De CCD ziet graag onder de doelstelling van het project een inkadering van de ziektebeelden waarvoor het onderzoek in dit project wordt toegepast.

Reactie aanvrager

De reactie van de aanvrager op bovenstaande vragen:

Citaat antwoord vraag 1: "Aangezien onze klanten in verschillende stadia van ontwikkeling van hun kandidaatstoffen gebruik maken van onze expertise, verschillen de doelen en vraagstellingen per klant en per teststof. Een deel van de stoffen is nieuw ontwikkeld of gericht tegen nieuwe targets, terwijl voor andere teststoffen al meer bekend is en bijvoorbeeld verdere opheldering van het werkingsmechanisme gevraagd is. Deze factoren maken het lastig om algemene entreecriteria voor de teststoffen vast te leggen.

Om voor elke klant en elke teststof de specifieke hypothese te kunnen beantwoorden, ontwerpen we de studie-opzet voor de experimenten altijd in

samenspraak met de klant. Hierbij wordt de benodigde beschikbare achtergrondinformatie actief met ons gedeeld en in de studie-opzet verwerkt. Voor elk experiment wordt een afweging gemaakt tussen het te verwachten ongerief voor de dieren en de toegevoegde waarde voor het onderzoeksveld. De experimenten die wij met teststoffen uitvoeren zijn vaak juist onderdeel van een pakket aan experimenten benodigd voor het vaststellen van de toegevoegde waarde van een potentieel geneesmiddel. Vaak gaat het om stoffen die door de klant geselecteerd zijn uit een groep van kandidaatstoffen met behulp van bijvoorbeeld high-throughput screening of andere in vitro studies. Het kan echter ook gaan om reeds toegelaten geneesmiddelen waarvoor getest wordt of ze ook voor een nieuwe indicatie toegepast kunnen worden. Een uitkomst van onze studies kan dan bijvoorbeeld zijn dat het target-systeem reageert op de teststof, maar ook dat er geen off-target-effecten zijn. Uit de resultaten van onze experimenten moet dan (mede) blijken of en waarom stoffen geschikt zijn om bepaalde ziektebeelden te behandelen. Deze resultaten geven, samen met de resultaten uit andere uitgevoerde experimenten met deze kandidaatstoffen, onze klanten de informatie om de eigenschappen en effecten van hun kandidaatstoffen te begrijpen en daarmee weloverwogen beslissingen te nemen over de verdere ontwikkelingsstappen voor hun potentiële geneesmiddelen."

Citaat antwoord vraag 2: "Zoals terecht opgemerkt draagt het onderzoek in het huidige projectvoorstel bij aan de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen verschillende ziekten van het zenuwstelsel. Hoewel wij niet kunnen voorspellen met welke kandidaatstoffen voor welke aandoeningen onze (toekomstige) klanten ons de komende jaren zullen benaderen, hebben we de afgelopen jaren kandidaatstoffen voor onze klanten getest op bijvoorbeeld werkzaamheid en specificiteit, maar soms ook op verslavingspotentieel. Dit waren potentiële geneesmiddelen tegen bijvoorbeeld acute en chronische pijn, ALS, depressie, schizofrenie, epilepsie, multiple sclerose, migraine, ADHD, seksuele disfunctie, motorische stoornissen, zeldzame erfelijke ziekten en de ziekten van Alzheimer, Huntington en Parkinson.

Het in dit projectvoorstel voorgestelde onderzoek is dus niet zozeer ziektebeeld-gebonden als wel methode- en mechanisme-gebonden. Zo zijn sommige effecten op bepaalde ion-kanalen potentieel geschikt voor meerdere medische indicaties. Stoffen die bepaalde kaliumkanalen activeren worden bijvoorbeeld gebruikt in onderzoek tegen chronische pijn maar ook tegen epilepsie."

Voorstel Secretariaat

Het onderzoek draagt bij aan de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen ziekten van het zenuwstelsel. Het betreft potentiële nieuwe geneesmiddelen of reeds toegelaten geneesmiddelen die mogelijk voor een nieuwe indicatie kunnen worden toegepast. In de ogen van het Secretariaat **5.2 lid 1**





> Retouradres Postbus 93144 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
t.a.v. 5.1 lid2e
5.1 lid2h

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93144
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0800-7890789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202114906

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
3

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 5 mei 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114906. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Omdat uit uw aanvraag niet blijkt welke typen stoffen, in welk stadium de te testen stoffen zich bevinden en voor welke ziektemodellen elke stof getest zal worden, is een voorwaarde opgenomen dat u jaarlijks aan de CCD moet terugkoppelen naar welke soort stoffen onderzoek plaats heeft gevonden. Deze voorwaarde is gesteld omdat de CCD graag een beeld wil krijgen van wat voor soort experimenten worden uitgevoerd onder deze vergunning. Op deze wijze houdt de CCD zicht op het soort experimenten dat gedaan wordt en het soort stoffen dat getest wordt.

U kunt met uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 augustus 2021 tot en met 10 juni 2026.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie 5.1 lid2h. Dit advies is opgesteld op 29 juni 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, maar voegen een voorwaarde van jaarlijkse terugkoppeling toe.

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

Bezwaar

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

Datum
3 augustus 2021

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5.1 lid2h 202114906

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 gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

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

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0800 7890 789.

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen

- Vergunning
- DEC advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 5.1 lid2h

Adres: 5.1 lid2h

Postcode en woonplaats: 5.1 lid2h

Deelnemersnummer: 5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 augustus 2021 tot en met 10 juni 2026, voor het project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114906, volgens advies van Dierexperimentencommissie. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 5 mei 2021
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen op 29 juni 2021;
 - b. Bijlage dierproeven 1, zoals ontvangen op 7 juli 2021;
 - c. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 juni 2021;
 - d. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 29 juni 2021;
 - e. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 juli 2021 en 16 juli 2021.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Tissue collection from mice and rats for ex vivo electrophysiological measurements	Muizen	300	90% licht 10% matig
	Ratten	300	90% licht 10% matig

Voorwaarden

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welk type teststof, in welk stadium van het onderzoek de teststof is (bijvoorbeeld oriënterend, eindstadium), voor welke ziektemodellen, welke wijze van uitvoering, in welke diersoort en het bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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.

Datum

3 augustus 2021

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD **317021** 202114906

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93144 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
t.a.v. 5.1 lid2e
5.1 lid2h

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93144
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0800-7890789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202114906

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
3

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 5 mei 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114906. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Omdat uit uw aanvraag niet blijkt welke typen stoffen, in welk stadium de te testen stoffen zich bevinden en voor welke ziektemodellen elke stof getest zal worden, is een voorwaarde opgenomen dat u jaarlijks aan de CCD moet terugkoppelen naar welke soort stoffen onderzoek plaats heeft gevonden. Deze voorwaarde is gesteld omdat de CCD graag een beeld wil krijgen van wat voor soort experimenten worden uitgevoerd onder deze vergunning. Op deze wijze houdt de CCD zicht op het soort experimenten dat gedaan wordt en het soort stoffen dat getest wordt.

U kunt met uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 augustus 2021 tot en met 10 juni 2026.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie 5.1 lid2h. Dit advies is opgesteld op 29 juni 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, maar voegen een voorwaarde van jaarlijkse terugkoppeling toe.

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

Bezwaar

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

Datum

3 augustus 2021

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD 5.14921 202114906

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 gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

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

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0800 7890 789.

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen

- Vergunning
- DEC advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en woonplaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 augustus 2021 tot en met 10 juni 2026, voor het project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD ^{5.1 lid2h} 202114906, volgens advies van Dierexperimentencommissie. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is ^{5.1 lid2e}.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 5 mei 2021
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen op 29 juni 2021;
 - b. Bijlage dierproeven 1, zoals ontvangen op 7 juli 2021;
 - c. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 juni 2021;
 - d. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 29 juni 2021;
 - e. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 juli 2021 en 16 juli 2021.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Tissue collection from mice and rats for ex vivo electrophysiological measurements	Muizen	300	90% licht 10% matig
	Ratten	300	90% licht 10% matig

Voorwaarden

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welk type teststof, in welk stadium van het onderzoek de teststof is (bijvoorbeeld oriënterend, eindstadium), voor welke ziektemodellen, welke wijze van uitvoering, in welke diersoort en het bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

Datum

3 augustus 2021

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD **5.1.1027** 02114906

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

5.1 lid2e

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 12 augustus 2021 09:03
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'; 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 02114906

20

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 05-05-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114906.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het verduidelijken van entrecriteria van de te testen stoffen en inkadering van de te onderzoeken ziektebeelden.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen, met toevoeging van een 5.1 lid2h voorwaarde. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 3 augustus 2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0800 7890789
E: info@zbo-ccd.nl

5.1 lid2h

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

Van: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
5.1 lid2h

Betreft: Terugkoppeling bijzondere voorwaarde(n) Projectvergunningen AVD 5.1 lid2h 016534,
AVD 5.1 lid2h 02114906 en AVD 5.1 lid2h

Datum: 31 maart 2022

Geachte CCD,

Gelieve hierbij te ontvangen de terugkoppeling van de bijzondere voorwaarde(n) verbonden aan onze vergunningen voor de projectvergunningen AVD 5.1 lid2h 016534, AVD 5.1 lid2h 02114906 en AVD 5.1 lid2h

In de drie bijlagen treft u een overzicht van de gevraagde gegevens betreffende de dierproeven uitgevoerd in de afgelopen kalenderperiode, 1 januari 2021 tot en met 31 december 2021, onder deze vergunningen. In de overzichten hebben wij –waar van toepassing- per studie aangegeven welke diersoort het betreft, het aantal gebruikte dieren en bijbehorend ongerief, alsmede het type teststof, type dierproef, ziektemodel of ziektebeeld.

Met betrekking tot de voorwaarde over het vrijgeven van informatie over type/soort geteste stoffen onder de projectvergunning: alle projecten onder deze projectvergunningen worden uitgevoerd onder contracten die afgesloten zijn tussen 5.1 lid2h en onze opdrachtgevers. Geheimhouding en/of vertrouwelijkheid wordt altijd opgenomen in een Master Services Agreement, Algemene Voorwaarden of Geheimhoudingsverklaringen door onze opdrachtgevers. Wij moeten hier als opdrachtnemer aan voldoen en onze opdrachtgevers hechten veel waarde aan deze geheimhouding. Deze geheimhoudingsclausules bepalen dat wij geen vertrouwelijke informatie kunnen of mogen delen met derden zonder toestemming van een opdrachtgever. De gegevens betreffende geteste stoffen vallen onder de vertrouwelijke informatie.

Vertrouwende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, verblijf ik met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Terugkoppeling **5.1 lid2h** voorwaarde

Periode waar terugkoppeling

betrekking op heeft: 2021

Naam instelling:

5.1 lid2h

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

Terugkoppeling betreft:

AVD **5.1 lid2h** 202114906

Ex-vivo elektrofysiologische weefsel analyse ten behoeve van ontwikkeling

Titel project: van nieuwe geneesmiddelen

Titel Bijlage Dierproeven	Diersoort	Aantal	Ongerief	Titel studie	Terugkoppeling volgens de voorwaarde in de vergunning	
					type stof	ziekte model
Ex-vivo elektrofysiologische weefsel analyse ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen	2	33	2	5.1 lid2h	Ion - channel inhibitor	Chronic pain

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 2 mei 2022 10:53
Aan: Info-zbo
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: [External]: RE: Ontvangstbevestiging terugkoppeling.

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Beste 5.1 lid2e,

via de beveiligde verbinding, hebben wij zojuist de gevraagde informatie aan u gezonden.
Graag vernemen wij of een en ander hiermee afdoende van een antwoord is voorzien.
Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

From: 5.1 lid2e
Sent: Thursday, April 28, 2022 6:44 PM
To: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Cc: 5.1 lid2e
Subject: RE: [External]: RE: Ontvangstbevestiging terugkoppeling.

Geachte 5.1 lid2e

Hierbij deel ik uw vraag met onze 5.1 lid2h collega's.
Wij zullen spoedig een respons verzorgen.
Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Sent: Thursday, April 28, 2022 9:12 AM
To: 5.1 lid2e
Subject: [External]: RE: Ontvangstbevestiging terugkoppeling.

Geachte 5.1 lid2e ,

Voor uw terugkoppeling betreffende uw projectvergunning over de periode 2021 ontbreekt enige informatie. In de opgelegde voorwaarde wordt gevraagd of inzicht kan worden gegeven over in welk stadium van het onderzoek de teststof is (bv. oriënterend, eindstadium) zich bevindt en op welke wijze dit wordt uitgevoerd. Kunt u de ontbrekende informatie aanleveren?

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Namens:

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800-7890789 E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 7 april 2022 16:14
Aan: 5.1 lid2e >
Onderwerp: Ontvangstbevestiging terugkoppeling.

Geachte 5.1 lid2e

Op 31 maart 2022 hebben wij de terugkoppeling betreffende uw projectvergunning dierproeven ontvangen voor de periode 2021. Het gaat om uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2e 02114906.

Uw terugkoppeling zal binnenkort door de CCD worden besproken. Kort daarna kunt u een terugkoppeling verwachten.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028
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.

Vertrouwelijk

Terugkoppeling: **5.1 lid2h** voorwaarde
Periode waar terugkoppeling
betrekking op heeft: 2021

24

Naam instelling: **5.1 lid2h**

Deelnemersnummer: **5.1 lid2h**

Terugkoppeling betreft: **AVL 5.1 lid2h 202114906**

Titel project: **Ex-vivo elektrofysiologische weefsel analyse ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen**

Titel Bijlage Dierproeven	Diersoort	Aantal	Ongerief	Titel studie	Terugkoppeling volgens de voorwaarde in de vergunning			
					type stof	stadium teststof	ziekte model	wijze van uitvoering
Ex-vivo elektrofysiologische weefsel analyse ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen	2	35	2	5.1 lid2h	Ion - channel inhibitor	Oriënterend	Chronic pain	Weefselcollectie t b v ex vivo elektrofysiologische analyse van teststoffen



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
t.a.v. 5.1 lid2e
5.1 lid2h

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0800 - 7890 789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Terugkoppeling 5.1 lid2h
AVD 5.1 lid2h 202114906

Datum 13 juni 2022
Betreft Terugkoppeling 5.1 lid2h -voorwaarde 2021

Geachte 5.1 lid2e,

Op 31 maart 2022 hebben wij de terugkoppeling betreffende uw projectvergunning dierproeven ontvangen voor de periode 2021. Het gaat om uw project "Ex vivo electrophysiology in tissue and cultured cells for the development of potential new treatments against neurological conditions" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114906. Uw terugkoppeling is voldoende.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris