

Inventaris Wob-verzoek W15-12									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015156								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
10	Mail DEC-advies 26-6-2015				x		x	x	
11	DEC-advies				x		x	x	
12	Mail ontvangstbevestiging 29-6-2015				x		x	x	
13	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
14	Mail aanvullende informatie DEC 16-7-2015				x		x	x	
15	Mail verzoek aanvullende informatie 21-7-2015				x		x	x	
16	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
17	Reactie aanvullende informatie				x		x	x	
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking				x		x	x	
20	Vergunning				x		x	x	
21	Mail beschikking 13-8-2015				x		x	x	
22	Mail terugkoppeling DEC 13-8-2015				x		x	x	



29 JUN 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 24700
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
 Naam instelling of organisatie Brains On-Line B.V.
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]
 KvK-nummer 2 0 9 4 7 2 4

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.
 Straat en huisnummer De Mudden 16
 Postbus
 Postcode en plaats 9747AW Groningen
 IBAN NL59INGB0681766174
 Tenaamstelling van het rekeningnummer BRAINS ON-LINE BV

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie [Redacted]
 Afdeling
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie [Redacted]
 Afdeling
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 15_06_2015
- Einddatum 15_06_2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van geneesmiddelen met behulp van biologische en elektronische sensoren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-RUG
- Postadres XXXXXXXXXX Groningen
- E-mailadres secrdec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Bijlagen (6)

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Groningen

Datum

26_06_2015

Handtekening



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Neurologische ziekten zoals de ziektes van Alzheimer, Parkinson en Huntington schizofrenie, chronische pijn en epilepsie zijn wereldwijd een van de grootste groepen van ziektes met daaraan gerelateerde economische consequenties. Ongeveer 25% van alle mensen hebben tijdens hun leven last van een neurologische aandoening. Door de demografische ontwikkelingen zal dit aantal alleen maar toenemen. De meeste therapieën zijn momenteel gericht op het herstellen van verbindingen in de hersenen. Op dit moment komen er jaarlijks 10-15 nieuwe stoffen op de markt die werkzaam zijn tegen deze ziekten, waar dat een aantal jaren geleden op het tienvoudige lag. Belangrijkste reden hiervoor (volgens "Medicines in Development for Neurological Disorders 2013" (rapportage van America's biopharmaceutical research companies)) zijn strengere en in aantal toegenomen toelatingseisen voor geneesmiddelen. Dit veroorzaakt een toename in tijdsduur en kosten die bij ontwikkeling van geneesmiddelen benodigd zijn. Met het huidige project is het de bedoeling een bijdrage te leveren aan het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen. Het doel is om farmaceutische bedrijven een passend inzicht te geven in de mogelijkheden van hun stof. Doestelling is hierbij dat door het concentreren van de expertise en het gebruiken van de modernste technieken sneller, en voor de maatschappij kosten efficiënter, tot een antwoord te komen. Hierbij wordt ook altijd gekeken naar welke test-methode het meest geschikt is voor het beantwoorden van een specifieke vraagstelling, en wordt rekening gehouden met de drie Vs: vervanging, vermindering en verfijning.

Het hier voorgestelde project bouwt voort op lopende projecten binnen ons bedrijf. Het bedrijf biedt contract onderzoek aan waarbij een aantal verschillende platforms voor het testen van nieuwe geneesmiddelen kunnen worden ingezet. In dit project beschrijven wij een tweetal technieken waarbij electrodes bij het dier worden ingebracht. Deze electrodes zijn geschikt om direct elektrische signalen af te leiden, of ze zijn door een biologisch active-coating geschikt gemaakt voor de detectie van specifieke biomoleculen. Metingen worden voornamelijk uitgevoerd in het centraal zenuwstelsel, maar kunnen ook perifeer worden toegepast.

De platforms vooral zoals verwoord in bijlagen 2, 4, 5 en 6 bevatten een aantal protocollen die inmiddels als SOPs worden ingezet binnen ons bedrijf voor het onderzoeken van potentiële geneesmiddelen tegen neurologische ziekten. Wij zijn van mening dat deze platforms niet alleen zeer geschikt zijn om te kijken naar farmacologische effecten van nieuwe potentiële geneesmiddelen in gezonde dieren, maar ook inzetbaar zijn om het effect van de potentiële nieuwe stof te testen in een toepasselijk pathologisch model. In de genoemde bijlagen zullen dan ook enkele voorbeelden van ons bekende modellen worden gegeven, wij zouden toepassing van de SOP echter niet willen beperken tot deze modellen, omdat onze sponsors vaak op basis van eigen vooronderzoek kiezen voor een specifiek model voor een ziekte, of omdat zij gebruik willen maken van de nieuwste beschikbare modellen in het onderzoeksveld. Hierbij moet voorop worden gesteld dat pathologie modellen die een duidelijk intrinsiek ongerief veroorzaken dat in een hogere categorie valt dan de hier aangevraagde (II matig) niet in aanmerking komen voor toepassing onder deze aanvraag.

Platform 1 Mircosensoren:

Neuronen communiceren door middel van elektrische signalen en signaalstoffen (o.a. neurotransmitters). Deze stoffen beïnvloeden op hun beurt de elektrische communicatie tussen cellen. Het meten en beïnvloeden van de elektrische signalen wordt hieronder beschreven in het gedeelte over electrofysiologie. De microsensoren die wij ontwikkelen zijn gericht op de detectie van de signaalstoffen. De belangrijkste signaalstoffen beschikbaar in de hersenen zijn de neurotransmitters die door interactie met de pre- en postsynaptische receptoren de elektrische signaaltransductie reguleren. In het recente

verleden hebben wij sensoren ontwikkeld voor de bepaling van glutamaat, GABA en acetylcholine. De huidige sensor is gebaseerd op een enzymatische omzetting van een bio-marker, waarbij een bekend aantal elektronen wordt overgedragen. Door deze enzymen te coaten op een sensor met een bekend spanningsverschil en de stroom te meten kan worden berekend hoeveel moleculen worden omgezet per tijdseenheid. De sensoren kunnen worden ingezet om met een zeer goede tijds- en ruimtelijke- resolutie, de niveaus van deze neurotransmitters te bepalen. Aangezien receptoren voor deze neurotransmitters gevonden worden in alle hersengebieden hebben werkzame stoffen op deze neurotransmissie vaak een brede uitwerking. Tevens spelen deze neurotransmitters een grote rol bij ziektes van het centraal zenuw stelsel zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend, de ziektes van Parkinson, Alzheimer, Huntington en Schizofrenie.

Naast deze ziektes spelen de hersenen ook een belangrijke rol bij perifere ziektes zoals diabetes, een ongeneeselijke ziekte waaraan wereldwijd bijna 300 miljoen mensen lijden. In de homeostase van voedselopname en energieverbruik spelen de hersenen een centrale rol. Op basis van detectie van niveaus van glucose, pyruvaat en lactaat, maar bijvoorbeeld ook van ATP bepalen de hersenen hoe de energie huishouding in balans moet worden gebracht. Ook voor deze biomarkers zijn inmiddels microsensoren ontwikkeld. Deze sensoren zouden overigens ook ingezet kunnen worden in onderzoek naar effecten van of geneesmiddelen tegen acidose.

Toepassing van de microsensoren geeft inzicht in de mechanismen van signaaltransductie in-vivo en werking van potentiële nieuwe geneesmiddelen. De methode wordt gezien als een zeer veel belovende analyse techniek voor toekomstige testen op nieuwe geneesmiddelen. Dergelijke testen zijn voorgeschreven door EMEA (European Medicines Administration) en de FDA (Food and Drug Administration).

Platform 2 Electrofysiologie:

Een tweede belangrijke methode om werkingsmechanismen en effectiviteit van een potentieel nieuw geneesmiddel te onderzoeken is het meten van de elektrische signalen in de hersenen. Veel bekende neuropathologieën zijn gebaseerd op een verandering van de vuurfrequentie van individuele cellen of een verandering in het aantal cellen dat elektrische signalen afgeeft. Door de verandering van het aantal signalen wordt de neurotransmissie beïnvloed, wat de ontwikkeling van neuropathologieën tot gevolg kan hebben. Door de vuurfrequentie van actief (autonoom) of passief (in reactie op een externe chemische of elektrische stimulus) vurende neuronen te meten en de uitwerking van stoffen op het vuren is het mogelijk om de farmacologische uitwerking van deze stoffen te bepalen.

Met behulp van dezelfde technieken is het ook mogelijk om elektrische signalen te meten in spierweefsel en zenuwbanen in het ruggenmerg. Meten van de signalen hier is van belang bij de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen pijn (zoals neuropathische pijn, pijn bij kanker) en spierziekten (zoals m.s.).

De kennis verworven in onderzoeken met bovenstaande methoden is translationeel, omdat ze tot op zekere hoogte een voorspelling geven van de werking van potentiële nieuwe geneesmiddelen bij toepassing in humane patienten. In ieder geval is het mogelijk om theorieën te testen over werkingsmechanismen van de stoffen. Uitvoeren van dit type preklinische testen is van groot belang voor het snel en goed selecteren van kandidaat stoffen voor verder klinisch onderzoek. Daarnaast is de informatie die wordt gewonnen uit deze experimenten van belang voor de wettelijke eis dat nieuwe geneesmiddelen moeten worden getest alvorens zij op de markt mogen worden toegelaten. Zowel EMEA (European Medicines Administration) als de FDA (Food and Drug Administration) vereisen voor nieuwe geneesmiddelen dat veiligheid en werkzaamheids (efficacy) farmacologie worden getest in ten minste twee typen proefdieren waarvan minimaal één niet knaagdier soort. De experimenten beschreven in deze aanvraag dragen bij aan informatie over de werkzaamheids farmacologie.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Hoofddoel van het huidige project is om via relevante platforms nieuwe farmaceutisch actieve stoffen gericht op het genezen van ziektes van met name het centraal zenuwstelsel (zoals de ziekten van Huntington, Alzheimer en Parkinson, maar ook multiple sclerose en chronische pijn) te testen op werkzaamheid. Tevens zijn de platforms zeer geschikt om observaties van neurologische bijverschijnselen van potentiële nieuwe geneesmiddelen voor andere ziekten nader

te bestuderen. De in deze aanvraag beschreven testmethoden zijn allen gebaseerd op versterking van (indirecte) elektrische signalen uit biologische systemen. Bij uitstek is het onderzoek erop gericht om metingen in het complete organisme uit te voeren om alle aspecten van de fysiologie en het metabolisme mee te kunnen nemen. Het is niet alleen de bedoeling de op dit moment ontwikkelde methoden in te zetten, maar ook om deze verder te ontwikkelen. Hierbij wordt rekening gehouden met de drie V's, waarbij nieuw ontwikkelde methoden dus moeten zorgen voor vermindering of verfijning en eventueel voor vervanging.

Microsensoren:

- Is het mogelijk nieuwe sensoren te ontwikkelen gericht op relevante biomarkers voor ziekten (met een focus op ziekten van het centraal zenuw stelsel)?
- Veroorzaken nieuwe potentiële geneesmiddelen veranderingen in de concentratie van de biomarker van interesse (betrokken bio-marker bij het ziekte proces)? Welk onderliggend mechanisme veroorzaakt de concentratie verandering? Is het effect van het potentiële geneesmiddel te prefereren boven dat van bestaande geneesmiddelen (potentie/bijwerkingen)?

Electrofysiologie:

- Welke electrofysiologische technieken gebaseerd op onze bestaande technieken zijn geschikt om te gebruiken in ten behoeve van onderzoek aan nieuwe potentiële geneesmiddelen? In welke hersengebieden is het mogelijk de vuurfrequentie van neuronen farmacologisch te beïnvloeden.
- Veroorzaken nieuwe potentiële geneesmiddelen meetbare electrofysiologische veranderingen in relevante hersengebieden? Welk onderliggend mechanisme veroorzaakt de verandering in vuurfrequentie? Is het effect van het potentiële geneesmiddel te prefereren boven dat van bestaande geneesmiddelen (potentie/bijwerkingen)?

De hierboven beschreven vraagstellingen zijn allen te beantwoorden met de in de bijlagen beschreven experimentele handelingen. Gezien de technische achtergrond: versterking van (indirecte) elektrische signalen uit biologische systemen zien wij de experimenten als een toetsbare eenheid. Haalbaarheid van de experimenten is gebleken uit het feit dat de beschreven experimenten al sinds langere tijd bij ons bedrijf worden uitgevoerd door zeer ervaren en gespecialiseerde medewerkers.

3.3 Belang

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

Voor zowel de microsensoren als de electrofysiologie geldt dat de maatschappij belang heeft bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen ziektes van het centraal zenuw stelsel. Deze ontwikkeling kan alleen gepaard gaan als deze potentiële geneesmiddelen worden getest op effectiviteit en werkingsmechanisme. Van een groot aantal van de bestaande geneesmiddelen blijkt dat ze in de praktijk niet voldoende effectief zijn bij alle patienten of dat er problemen optreden door bijwerkingen. Voor een deel worden deze problemen opgelost door betere kennis van het werkingsmechanisme van (nieuwe) stoffen of toedieningsvormen, maar ook door basale kennis over neuronale signaaltransductie. De in deze experimenten toegepaste technieken kunnen helpen bij het beantwoorden van deze vragen.

Het produceren van nieuwe, efficiëntere en meer robuuste sensoren (met bijvoorbeeld een grotere gevoeligheid en of betere houdbaarheid) voor bio-markers is een belangrijke ontwikkeling voor zowel wetenschap als maatschappij. Hierbij moet worden gedacht aan het vroegtijdig herkennen van ziektes op basis van bio-markers. Tevens zouden de sensoren ook kunnen worden ingezet voor een verbeterde kwaliteit van leven. De sensoren bieden de mogelijkheid om continu verschillende bio-markers voor ziektes te monitoren. Wanneer deze biomarkers boven of onder een bepaalde ingestelde limiet komen, zouden ze een signaal kunnen afgeven waarmee een pomp wordt geactiveerd. De sensor zou hierdoor een meer invasieve meting en toediening kunnen vervangen. Men kan hierbij bijvoorbeeld denken aan zowel het meten van bloedsuiker als het toedienen van insuline bij suikerpatienten dat wordt vervangen door een enkel meet en regelsysteem dat éénmalig moet worden geïmplant. Hierbij is van groot belang dat een sensor wordt ontwikkeld die voor langere tijd in het lichaam megedragen kan worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het hier aangevraagde project gebruikt verschillende meettechnieken gebaseerd op versterking van elektrische signalen ter bestudering van het centraal zenuwstelsel en een aantal perifere systemen. Het project bevat verschillende modules die naar keuze kunnen worden ingezet afhankelijk van de vraagstelling met betrekking tot het geneesmiddel of de biomarker van interesse. Deze vraagstelling gaat vaak over een specifiek (deel-)mechanisme van de werking van een nieuwe of bestaande stof testen. De beschrijving van de verschillende modules is te vinden in paragraaf 3.4.2.

Voor de ontwikkeling van sensoren voor nieuwe biomarkers is sprake van een plan met enkele opeenvolgende stappen. Voor alle proeven die worden uitgevoerd in het kader van dit project geldt dat onder anesthesie één of meerdere electrodes worden ingebracht bij het dier. Voor de electrofysiologische experimenten geldt dat de experimenten non-recovery zijn. Voor de sensoren is het mogelijk om ze met behulp van transponder technieken ook in vrij bewegende dieren, die de mogelijkheid krijgen gedrag te vertonen, uit te voeren. Testen voor stabiele lange termijn implantatie (tot 30 dagen) van sensoren wordt ook uitgevoerd in vrij bewegende dieren.

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

Ontwikkeling van nieuwe microsensoren:

De ontwikkeling van een nieuwe microsensor is gebaseerd op een vraagstelling naar het meten van een specifieke nieuwe biomarker, of van een bestaande biomarker waarvoor de gevoeligheid met andere methoden of de resolutie in tijd en ruimte niet hoog genoeg is. De eerste ontwikkeling van een dergelijk sensor vindt plaats in-vitro. Na een literatuurstudie naar een geschikt biomolecuul (bijvoorbeeld: enzyme/antibody/nucleinezuur) op basis waarvan de sensor gemaakt zou kunnen worden (op basis van substraat-specificiteit, te verwachten metabolieten en de noodzaak van een verandering in elektrische eigenschappen van de sensor in reactie op substraat binding) kan een eerste prototype sensor in elkaar worden gezet. Hierbij is vooral onze kennis over polymerisatie van de "supportlayers" van groot belang. Een dergelijke sensor moet getest worden op selectiviteit voor de bio-marker, gevoeligheid voor de bio-marker (als deze niet volstaat in fysiologische condities, heeft het geen zin de sensor in-vivo te testen) en op stabiliteit, het signaal moet minimaal één dag sterk genoeg zijn om te kunnen meten. Voor dit deel van het project zijn geen dierproeven nodig.

Als aan alle bovenstaande condities is voldaan kan worden gestart met de in-vivo validering van de sensor. Deze wordt altijd onder anesthesie uitgevoerd op het target gebied van interesse, bijvoorbeeld een specifiek hersen gebied. In parallel met de metingen met de sensor worden vaak ook bloed of microdialyse monsters genomen om een tweede onafhankelijke meting uit te kunnen voeren of de met de sensor gemeten waarden overeenkomen met de op andere wijze gemeten waarden. Plasma en dialyse monsters kunnen met behulp van massaspectrometrie of ELISA worden gequantificeerd. In eerste instantie wordt gekeken naar basale niveaus van de bio-marker. Door in-situ de biomarker concentratie te verhogen kan worden getest of de sensor ook reageert op veranderingen. Als de sensor voldoet kan worden gekozen voor een eerste farmacologische beïnvloeding met een bekende stof. Voor dit deel van het project wordt gebruik gemaakt van dieren onder anesthesie. Bij voorkeur, maar niet uitsluitend, worden ratten gebruikt vanwege het lichaamsformaat.

Toepassen van reeds gevalideerde microsensoren:

Op dit moment hebben wij bij Brains On-Line een aantal sensoren die reeds zijn gevalideerd op bovenstaande wijze. Het gaat hier om sensoren voor: glutamaat, gamma-aminoboterzuur (GABA), (acetyl-)choline, glucose, lactaat/pyruvaat, waterstofperoxide en ATP. Deze sensoren zijn geschikt voor toepassing in de hersenen en perifere weefsel. Farmacologische beïnvloeding van de biomoleculen is mogelijk met bestaande stoffen, de veranderingen in concentratie zijn meetbaar in-vivo. Deze sensoren zijn geschikt voor meten van effecten van bestaande en nieuwe farmaca gericht op glutamaterge, gaba-erge of cholinerge neurotransmissie of het beïnvloeden van de energiebalans. Deze experimenten kunnen zowel in rat als muis worden uitgevoerd (afhankelijk van het doelgebied), meestal worden ze onder anesthesie uitgevoerd, omdat de sensoren niet altijd robuust genoeg zijn om vrije beweging toe te laten (gevaar van breken, maar ook van stoorsignalen).

Doorontwikkeling van gevalideerde microsensoren:

Sensoren die aantoonbaar functioneel zijn voor in-vivo toepassingen moeten worden voorbereid voor gebruik in een meer klinische setting, zodat ze in de toekomst kunnen dienen als basis voor meet en regel instrumenten (bv. insuline pomp bij diabetes). Hiervoor zijn drie stappen nodig: de sensoren moeten

robuust genoeg zijn om in vrij bewegende dieren (en mensen) intact te blijven. De sensoren moeten voorbereid worden om zonder additionele bedrading te functioneren (in vrij bewegende dieren). Hiervoor is het mogelijk met een kleine versterker op het lichaam te werken die telemetrische data kan doorsturen voor uitlezen. Een eerste versie van een dergelijk systeem is in het verleden getest, alternatieve systemen met minder achtergrond signaal zijn beschikbaar en zouden ook getest kunnen worden. De tweede belangrijke stap is biocompatibiliteit van het gebruikte materialen deze moet geoptimaliseerd om de levensduur van de sensoren te verlengen. Verder wordt het programma gebruikt om te kijken naar mogelijkheden om gevalideerde sensoren te combineren met bestaande sensoren voor bijvoorbeeld electrocardiografie. Doel is om deze experimenten waar mogelijk in vrij bewegende dieren uit te voeren, bij voorkeur gaat het dan weer om ratten in verband met de grootte van de telemetrie zender.

De technieken voor electrofysiologie zijn voldoende ontwikkeld binnen Brains On-Line en zullen altijd worden toegepast als bestaande techniek. De techniek valt uiteen in drie gebieden. Deze zullen hieronder apart beschreven worden, als ook de mogelijkheden tot het verder ontwikkelen binnen de techniek.

In-vivo single unit electrophysiology:

Bij deze methode wordt een glaselectrode langzaam door een opening in de schedel naar binnen gebracht. Ter hoogte van het hersengebied met de doelcellen wordt een meting aangevangen. Bij deze meting wordt de vuurfrequentie van de cellen bepaald ofwel het aantal actieve cellen per trackt (in dat geval wordt ook nog vaak de vuurfrequentie bepaald). Door toedienen van farmaca of bij bepaalde genetisch gemodificeerde diermodellen veranderen de vuurfrequentie of het aantal actieve cellen per trackt. Dit kan een indicatie zijn voor het werkingsmechanisme van de gemodelleerde ziekte of de toegediende stof. Op dit moment zijn er zeven celtypes die wij op basis van onze kennis goed kunnen karakteriseren en bestuderen. In de toekomst zouden dit er meer kunnen worden. Alle experimenten worden uitgevoerd onder anesthesie in zowel ratten als muizen.

LTP/LTD:

Long term potentiation of long term depression metingen kunnen worden uitgevoerd op vergelijkbare wijze als metingen voor in-vivo single unit. Bij dit type van studie zijn de cellen echter niet spontaan actief, maar reageren ze op een stimulatie (met behulp van een tweede electrode) vanuit een tweede hersengebied. De stimulerende electrode geeft signalen af met een specifieke frequente die excitatoire post-synaptische potentialen opwekken, deze potentialen stimuleren de (post-synaptische) neuronen, waarvan de vuurfrequentie gemeten kan worden na deze stimulatie. De postsynaptische neuronen beginnen ook te vuren, waarbij de amplitude afhankelijk is van de stimulatie en/of farmacologische beïnvloeding. LTP en LTD zijn een maat voor synaptische plasticiteit. Synaptische plasticiteit is weer te relateren aan cognitieve functies (leren en geheugen). Gebaseerd op statistische analyse hebben we voor dit type experimenten 6 dieren per groep nodig. Tot nog toe zijn deze experimenten alleen in ratten uitgevoerd, maar wij zouden graag kijken naar de mogelijkheid om het ook in muis uit te voeren. Daarnaast is tot op heden alleen gekeken naar interactie tussen de Schaffer collateraal en de piramidale cellen in het CA1 gebied van de hippocampus. Het zou interessant kunnen zijn om in de toekomst ook naar interacties tussen andere hersengebieden te kijken bijvoorbeeld in het kader van synaptische plasticiteit bij bijvoorbeeld de ziekte van Parkinson of schizofrenie. Alle experimenten worden onder anesthesie uitgevoerd.

Spinal cord neuronen en electromyography:

Spinal cord neuronen worden op vergelijkbare wijze als hierboven beschreven voor de single unit electrophysiology gemeten. Het opereren van het dier onder anesthesie is een iets uitgebreidere procedure, omdat eerst de ruggenwervels vrijgeprepareerd moeten worden, en daarna het bot verwijderd. Pas dan is het mogelijk een pipet te laten zakken tot de juiste diepte voor metingen van de elektrische signalen. Deze routine techniek wordt in verschillende laboratoria over de wereld ingezet, maar nergens aangeboden als onderdeel van een geneesmiddelen evaluatie programma. Waar nodig en mogelijk werken wij samen met de academische experts op dit gebied om de techniek zo efficiënt mogelijk in te zetten. Intern is er ervaring met het vrijprepareren van de zenuwbanen in het ruggenmerg in een experimentele methode voor microdialyse en voor sensing.

De Hoffmann (H-) en flexor (M-) reflexen zijn beschreven voor zowel de mens als in de rat. De H-reflex wordt toegeschreven aan monosynaptische excitatie door de afferente neuronen van de primaire spierspoelen van de alpha motorneuronen. De M-reflex is een directe excitatie door de motorneuronen. Het verschil in amplitude en de tijdsduur tussen meting van de twee excitatoire potentialen is een maat voor de geleiding van de motorneuronen. Deze kunnen door verschillende ziektes (MS en de ziekte van Parkinson) door beschadiging van de zenuw of door pijn worden beïnvloed. Het meten van de potentialen is

tijdens een pilot studie gevalideerd. In vervolg studies willen we kijken naar pathologie modellen en bijpassende farmacologische mogelijkheden tot herstel. Alle experimenten worden onder anesthesie uitgevoerd, bij voorkeur in ratten.

Voor alle beschreven toepassingen kan het zinvol zijn een tweede sensor / sonde / catheter voor bloedmonster afname bij het dier aan te brengen. Een dergelijke sensor / sonde / catheter dan data opleveren die de gemeten data kan valideren, of die verdere informatie kan leveren als de farmacokinetiek (verdeling van de compound over het lichaam over de tijd). Door het vergelijken van dergelijke data met data uit bijvoorbeeld gedragsexperimenten is het mogelijk een koppeling te maken tussen dat uit verschillende toegepaste diermodellen (aangeboden platforms binnen ons bedrijf).

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

Zoals hierboven beschreven is de belangrijkste samenhang tussen de beschreven experimenten gebaseerd op de centrale techniek van het versterken van elektrische signalen opgewekt in biologische systemen. De elektrische signalen zijn danwel directe actie-potentialen ofwel veranderingen in de elektrische eigenschappen van een sensor ofwel een stroom opgewekt door biochemische conversie van een geselecteerd substraat.

Faseringen:

Ontwikkeling van nieuwe microsensoren: Ontwikkeling van nieuwe microsensoren start altijd met het zoeken naar een geschikt bio-actief molecuul voor het substraat (de biomarker van interesse). Als een passend molecuul gevonden is, moet worden gecontroleerd of conversie van het substraat leidt tot een verandering in elektrische eigenschappen of vorming van electronen die kunnen worden gemeten en geamplificeerd. Het is van groot belang te testen of de gevoeligheid van het systeem laag genoeg is om in fysiologisch relevante concentraties te kunnen meten. Alleen als het geval is, is het zinvol om ook daadwerkelijk in een in-vivo systeem onder anesthesie te gaan meten. Daarbij moet goed worden gelet op biologische of elektronische interferentie in het systeem. Door toediening van het substraat van interesse kan worden gekeken of in-vivo sensitiviteit en limiet van kwantificeren ook kan worden gehaald en of het mogelijk is om real time veranderingen te meten. Milestones zijn nieuw ontwikkelde sensoren voor toepassing in studies naar effecten van nieuwe geneesmiddelen.

Toepassen van reeds gevalideerde microsensoren: Wanneer een sensor effectief is gebleken in bovengenoemde in-vivo testen kan deze worden ingezet voor het meten van biomarkers in proefdieren en de effecten van nieuwe of bestaande farmaceutische verbindingen op de levels van deze biomarkers. Op dit moment hebben wij sensoren in dit stadium voor glutamaat, GABA, Acetylcholine (en Choline), Glucose, Lactaat, Pyruvaat, waterstofperoxide en ATP. De milestones voor deze experimenten zijn de behaalde resultaten per potentieel nieuw geneesmiddel.

Doorontwikkeling van gevalideerde microsensoren: De doorontwikkeling van de sensoren vindt plaats op meerdere vlakken. Allereerst wordt er gewerkt aan een draadloos systeem. Hierbij wordt gebruik gemaakt van bestaande telemetrie (en versterker) eenheden die worden gekoppeld aan de sensor. Een tweede ontwikkeling is toepassing van de lactaatsensor in de humane verloskunde. Deze sensor zou vlak voor en tijdens de partus kunnen worden ingezet om de verzuring in het bloed van een nog ongeboren kind te kunnen volgen, gelijktijdig met meting van hartfrequentie en zuurstofsaturatie. Voor deze toepassing moet de reeds bestaande sensor zo worden gemodificeerd dat hierop de lactase kan worden gecoat en de enzymactiviteit op basis van elektrische geleiding kan worden bepaald. Een vergelijkbaar proces zou kunnen worden ondernomen voor de ontwikkeling van een glucose sensor met toepassingen voor diabetes. Verdere toepassingen zouden kunnen worden gevonden in het bestuderen van lactaat en pyruvaat tijdens inspanningsoefeningen. Voor al deze toepassingen in-vivo in vrijbewegende dieren of mensen is het ook van belang aandacht te besteden aan de robuustheid van de sensor. Ook hiervoor zouden individuele experimenten in proefdieren zinvol zijn.

Milestones van dit project zijn: robuuste sensoren, telemetrie, biocompatibiliteit, biofouling van de sensor, combinatie van deze factoren tot een robuust systeem voor lange termijn implantatie in vrijbewegende dieren en/of mensen.

De technieken voor electrofysiologie zijn voldoende ontwikkeld binnen Brains On-Line en zullen altijd worden toegepast als bestaande techniek. De techniek

valt uiteen in drie gebieden (deze moeten worden gezien als aangeboden platforms en niet als opvolgende toepassingen). Deze gebieden zullen hieronder apart beschreven worden, alsook de mogelijkheden tot het verder ontwikkelen binnen de techniek. De toegepaste techniek is afhankelijk van de vraagstelling bij de test-stof. De milestones voor deze experimenten zijn de behaalde resultaten per potentieel nieuw geneesmiddel.

In-vivo single unit electrofysiology: met deze techniek kan het effect van (nieuwe) geneesmiddelen op de vuurfrequentie van individuele cellen worden gemeten. De toegediende stof kan door interactie met receptoren op de cel of op gekoppelde cellen een verandering in vuurfrequentie van die cel veroorzaken. Deze verandering is dan een indicatie voor een verandering in uitstoot van de betrokken neurotransmitter. Door bekende agonisten of antagonistische van een specifieke receptor te gebruiken kan het effect van de interactie worden omgekeerd, daarmee is het mogelijk om het werkingsmechanisme van een stof te verifiëren. Door het uitvoeren van zogenaamde trackt metingen, waarbij de electrode van boven naar beneden door een bepaald hersengebied wordt geleid kan ook worden gekeken naar het aantal en type cel (op basis van vuurfrequentie) dat door een stof wordt beïnvloed. De methode wordt sinds 2005 uitgevoerd bij Brains On-Line op zowel ratten als muizen.

LTP: Meer recent zijn we begonnen met het meten van zogenaamde LTP effecten, waarbij wordt gekeken naar het effect van stoffen op het versterken of remmen van bepaalde neuronale connecties in de hersenen. Op dit moment wordt hierbij vooral gekeken naar pathways betrokken in cognitie, het is mogelijk om aan te tonen dat bepaalde stoffen die in gedrag onderzoek de cognitie versterken of verminderen ook invloed hebben op de communicatie tussen bepaalde cel clusters in de hersenen. Dit is te meten, doordat ten opzichte van een controle groep er een sterkere of minder sterke koppeling is tussen de stimulatie met een specifieke frequentie en de amplitude van de postsynaptische response. Door LTP testen kan het werkingsmechanisme en de effectiviteit van een nieuwe geneesmiddel worden bepaald. De methode wordt momenteel alleen uitgevoerd in ratten maar zou ook interessant kunnen zijn om te ontwikkelen in muizen omdat veel genetische modellen in muis beschikbaar zijn. Daarnaast willen we de mogelijkheid onderzoeken om de techniek ook op andere cel clusters toe te passen om bijvoorbeeld effecten van de ziekte van Parkinson te bestuderen.

Spinal cord neuron en electromyography: Deze technieken focussen op zeer specifieke neuronen, maar zijn in essentie vergelijkbaar met de bovenbeschreven technieken. De reden om ze apart te noemen is dat de locatie van de neuronen erg specifiek is en dit een separate beschrijving van de biotechnische handelingen vereist. De technieken zijn ontwikkeld om te kijken naar geneesmiddelen die neuroprotectief werken of fysieke schade kunnen herstellen. Als laatste, zou het mogelijk kunnen zijn om met deze technieken de effecten van pijnstillers op de perifere neuronen betrokken bij de pijnsignaling te kwalificeren.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Ontwikkeling van nieuwe microsensoren
2	Toepassen van bestaande microsensoren
3	Doorontwikkelen van gevalideerde microsensoren
4	Single cell electrophysiology
5	Long Term Potentiation / Long Term Depression
6	Spinal cord electropfysiology en electromyography
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---------------------------------------|
| 1 | Ontwikkeling van nieuwe microsensoren |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor de farmacologische karakterisatie van nieuwe geneesmiddelen zijn verschillende technieken beschikbaar, deze technieken hebben hun eigen beperkingen, een van de belangrijkste voordelen van de toepassing van biosensoren is dat ze een zeer goede tijdresolutie hebben (milliseconde range) en ook dat ze zeer klein zijn (5-200 micrometer). De variatie van detecteerbare biomarkers voor ziektes (van het centraal zenuw stelsel) is relatief groot, dat maakt potentiële toepassingsgebieden groot. Een belangrijke uitdaging is echter het vinden van biologisch actieve moleculen (bijvoorbeeld: enzym, antibody of DNA) die specifiek zijn voor de detectie van één biomarker. Daarnaast moet de interactie tussen het biologisch actieve molecuul en de biomarker resulteren in een verandering van elektronische eigenschappen (bijvoorbeeld het vrijkomen van elektronen of verandering van een weerstand). Het onderliggende

systeem van het versterken en meten van een electronstroom is relatief universeel. Toch is het van groot belang dat voor alle biosensoren grondig vooronderzoek plaats vindt. Allereerst moet een passend biologisch actief molecuul gevonden worden bij de biomarker, dan moet er een goede bron worden gevonden voor dit molecuul. Het molecuul moet stabiel genoeg zijn om op een electrode gecoat te worden en enkele dagen tot maanden zijn activiteit weet te behouden.

Alvorens over te gaan op in-vivo toepassingen moet een nieuwe sensor uitgebreid in-vitro worden getest: is er inderdaad een stochastische omzetting (geeft een hogere bad concentratie van de biomarker een hoger signaal)? Zijn er potentieel interfererende stoffen of tussenproducten die ook een signaal afgeven? Is de gevoeligheid van de sensor voldoende om fysiologisch relevante concentraties en veranderingen daarin te detecteren? Pas wanneer deze vragen positief beantwoord kunnen worden is het zinvol over te gaan tot het in-vivo testen van de sensoren. In-vivo metingen zijn er in eerste instantie op gericht om de in-vitro data te herhalen, in de totale fysiologie van levende organismen zijn toch vaak nog interfererende signalen van andere biomoleculen of elektrische signalen die het lastig maken om in-vivo relevante metingen te kunnen uitvoeren. Indien dit het geval is is het nodig om het design van de sensor te heroverwegen. Het is mogelijk om de biomolecuulcoating in verschillende lagen uit te voeren waardoor permeabiliteit van verschillende moleculen differentieel wordt gereguleerd, waardoor interferentie wordt verminderd.

Wanneer er sprake is van een goed meetbaar signaal, dat duidt op een fysiologisch relevante concentratie van de biomarker, is het mogelijk om de concentratie van die biomarker te beïnvloeden. Dit kan door lokaal toedienen van een kleine hoeveelheid vloeistof met de betrokken biomarker, of door farmacologische beïnvloeding, afhankelijk van de te testen biomarker. Indien de read-out van de sensor een relevante concentratie verandering weerspiegelt kan de ontwikkeling van de sensor als succesvol worden beschouwd. De sensor is dan klaar voor toepassing in meer routinematig in-vivo onderzoek.

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

Voor dit type experimenten worden dieren onder anesthesie gebracht (inhalatieanesthesie), op de locatie waar de sensor moet worden ingebracht wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt. Het doelgebied van de sensor wordt toegankelijk gemaakt, ofwel door de vorming van een (sub-cutane) pocket of door het boren van een kleine opening in de dorsale zijde van de schedel. Afhankelijk van de locatie wordt ook gewerkt met een vloeibaar of gelvorming topicale analgeticum. Nadat voldoende tijd is verstreken voor het locale analgeticum om werkzaam te zijn wordt de sensor ingebracht. Zodra de sensor op de juiste locatie zit wordt deze vastgezet om signaalverstoring door beweging tegen te gaan. Na het meten van een stabiele baseline waarde (dit kan een aantal uren duren) worden één of meerdere toedieningen lokaal of systemisch gegeven die de biomarker concentratie moeten beïnvloeden, om de werking van de sensor in-vivo te testen. Dit kan de biomarker zelf zijn, maar ook een bekende stof die de biomarker specifiek beïnvloed (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een PDE inhibitor voor het meten van cyclische nucleotiden). Indien de toediening succesvol is geweest kan het experiment worden beëindigd. Dit vindt altijd plaats door het toedienen van een overdosis pentobarbital in de bloedbaan. In veel gevallen wordt ook dan nog met de sensor doorgemeten, omdat toediening van barbituraten ook als een vorm van farmacologische beïnvloeding kan worden beschouwd. Na afloop van het experiment wordt de sensor zo goed mogelijk vrijgeprepareerd om de locatie van de tip vast te kunnen stellen en eventuele effecten van de sensor op het omliggende tissue te meten. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat de sensor wordt aangebracht. De bloedmonsters worden gebruikt om parallel aan de sensor bepaling een analyse te kunnen doen van de concentratie van de biomarker of de test-stof gebruikt voor de farmacologische beïnvloeding.

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

Aangezien het in deze experimenten om validatie gaat zijn 3-5 dieren per biomarker voldoende om vast te stellen dat een sensor in-vivo geschikt is. Door uitgebreide testen in-vitro wordt het aantal in-vivo experimenten tot een minimum beperkt. In de in-vitro test wordt in een beerglas gekeken of de sensor de biomarker van interesse kan detecteren in een fysiologisch relevante concentratie. Tevens worden bekende competitieve biomarkers getest, om zeker te zijn dat deze in fysiologische concentraties geen signaal geven. Het is van belang om te zien dat een bepaalde sensor reproduceerbaar kan worden ingezet,

daarom is een minimum van 3 herhaalde succesvolle experimenten per sensor nodig. In een enkel geval zal een in-vitro geteste sensor in-vivo onverwachte signalen oppikt, in dat geval zal er een nieuwe sensor moeten worden ontwikkeld in-vitro waarbij door toepassing van coating een betere specificiteit wordt bewerkstelligd. Voor het oorspronkelijke design zullen in een dergelijk geval minder dieren nodig zijn, maar voor het nieuwe design weer 3-5 dieren. Tevens zou het mogelijk kunnen zijn dat er meer dieren nodig zijn, bijvoorbeeld als er in de kleine geteste groep sprake zou zijn van een sub-populatie. Mogelijk zouden deze dieren echter moeten worden gebruikt onder de dierproefbeschrijving van de toepassing van de bestaande microsensor (beschrijving 2), omdat het bestaan van dergelijke sub-populaties natuurlijk geen invloed heeft op de werkzaamheid van een sensor.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van wild-type (niet transgene) ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doelstructuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals beschreven in bijlage 2 of een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, in alle gevallen zal gebruik worden gemaakt van jong volwassen dieren, aangezien dit de meest voorkomende standaard groep is waaraan geneesmiddelen onderzoek wordt uitgevoerd. Geschatte aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar maximaal 20 verschillende nieuwe sensor ontwerpen te gaan ontwikkelen voor verschillende biomarkers. Met een groepsgrootte van 5 dieren per biomarker en een slagingspercentage van 80% (gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment en complicaties tijdens de ingreep de belangrijkste oorzaken) zou het om een totaal aantal van $5 * 20 / 0.8 = 125$ dieren gaan.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Aangezien de uiteindelijke toepassing van de sensoren is gebaseerd op de wettelijke eis dat nieuwe geneesmiddelen worden getest in levende dieren is het onontkoombaar dat deze experimenten worden uitgevoerd in levende dieren. Vervanging in dit stadium van de experimenten is niet mogelijk aangezien de toepassing van deze sensoren gericht is op fysiologische processen in intacte levende wezens. Het complexe samenspel van de verschillende biomoleculen in

het lichaam maken dat verstoringen die niet in de in-vitro test zijn waargenomen toch zorgen voor een verstoring van het signaal. Farmacologische beïnvloeding van de biomarker verschilt vaak ook tussen het intacte wezen en ex-vivo metingen (kinetiek en metabolisering van stoffen). Elk model waarbij dus niet de totale fysiologie van het organisme wordt meegenomen vergroot het risico op falen van het meetsysteem in vervolg stappen en uiteindelijk bij de translationele waarde van de metingen voor nieuwe geneesmiddelen.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Aan de vermindering van het aantal dieren wordt gewerkt door de uitgebreide voorscreens van de mogelijke sensoren. Als deze in-vitro niet laten zien dat ze een goede selectiviteit of gevoeligheid hebben worden ze niet toegepast in levende dieren. Daarnaast zal per sensor type worden gekeken naar de robuustheid van de meting van basale waarden, om zo tot een goed oordeel te kunnen komen of na 3 dieren kan worden gesproken van een functionele sensor. Verfijning van de experimenten vindt plaats doordat elke sensor voor en na toepassing in-vivo wordt gecalibreerd. Als de sensor bij pre-calibratie niet voldoet aan de kwaliteitseisen zal deze niet worden ingezet in een in-vivo experiment. Anesthesie wordt pas ingeleid nadat een positief resultaat uit de pre-calibratie is behaald. Verdere verfijning zit in de wijze van inbrengen van de sensor, door goede overweging van de locatie, het maken van een passend ontwerp voor die locatie en training van de uitvoerende biotechnicus voor de bijbehorende operatieve ingreep kan de experimentele afloop worden geoptimaliseerd. Afweging van de te gebruiken farmaca en biomarker zijn ook belangrijk voor het optimaal in-vivo testen van een sensor. De laatste mogelijkheid tot verfijning is het inbrengen van een tweede sonde die de met de sensor gemeten waarden kan valideren, of die gebruikt kan worden om de kinetiek van de toegepaste stof te bepalen. Dit is uiteraard alleen mogelijk als een geschikte sonde en analyse methode beschikbaar is.

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

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van locale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Door uitgebreid literatuuronderzoek en bezoek aan internationale bijeenkomsten wordt zorggedragen voor een zo up-to-date mogelijke kennis van het veld. Veel microsensoren worden in-vitro ontwikkeld, maar halen zelden toepassing in-vivo, of blijken bij in-vivo toepassing niet functioneel. Deze kennis levert een grote bron van informatie over mogelijkheden. Door onze kennis van biocoating kunnen wij beschreven microsensoren optimaliseren voor in-vivo toepassingen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer

de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten. Binnen de organisatie is uitgebreide kennis en ervaring aanwezig over uitvoeren van experimenten onder stabiele lange termijn anesthesie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing

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

Niet van toepassing

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de sensor op de juiste plaats was geïmplanteerd. Omdat hierbij het tissue rond het implantaat moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Toepassen van bestaande microsensoren"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voordat een geneesmiddel mag worden toegepast in de kliniek moet eerst in-vivo worden gedemonstreerd dat het middel werkzaam en niet toxisch is. Waar mogelijk moet worden gestreefd een werkingsmechanisme te postuleren en eventuele specifieke acties. Voor de farmacologische karakterisatie van nieuwe geneesmiddelen zijn verschillende in-vivo technieken beschikbaar, deze technieken hebben hun eigen beperkingen, een van de belangrijkste voordelen van de toepassing van biosensoren is dat ze een zeer goede tijdsresolutie hebben (milliseconde range) en ook dat ze zeer klein zijn (5-200 micrometer). Deze eigenschappen maken de microsensoren zeer geschikt voor het monitoren van bijvoorbeeld neurotransmitters in de hersenen of bloedglucose waarden (relatief snelle processen in het lichaam). Ze worden dan ook wel beschouwd al de belangrijkste toekomstige methode voor analyse van biomarkers.

De experimenten die wij onder deze dierproeven willen uitvoeren hebben tot doel het meten van de effecten van nieuwe en referentie geneesmiddelen op concentraties van glutamaat, gamma-aminoboterzuur, acetylcholine, glucose, lactaat, pyruvaat, waterstofperoxide of ATP. Sensoren die succesvol zijn ontwikkeld onder volgnummer 1 van dit projectvoorstel zouden ook ingezet moeten kunnen worden voor deze experimenten. Metingen kunnen zowel in de hersenen als perifeer worden uitgevoerd.

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

Voor dit type experimenten worden dieren onder anesthesie gebracht (inhalatieanesthesie of injectie anesthesie wanneer neurotransmitter systemen worden gemeten die door inhalatie anesthesie worden beïnvloed), op de locatie waar de sensor moet worden ingebracht wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt. Het doelgebied van de sensor wordt toegankelijk gemaakt, ofwel door de vorming van een (sub-cutane) pocket of door het boren van een kleine opening in de dorsale zijde van de schedel. Afhankelijk van de locatie wordt ook gewerkt met een vloeibaar of gelvorming topicale analgeticum. Nadat voldoende tijd is verstreken voor het locale analgeticum om werkzaam te zijn wordt de sensor ingebracht. Zodra de sensor op de juiste locatie zit wordt deze vastgezet om signaalverstoring door beweging tegen te gaan. Na het meten van een stabiele baseline waarde (dit kan een aantal uren duren) worden één of meer stoffen toegediend en wordt gekeken naar het effect van de toegediende stof of de biomarker concentratie. De toe te dienen stoffen zijn in dit geval ofwel een potentieel nieuw geneesmiddel waarvan de werking moet worden getest en/of een referentiestof die een bekende werking heeft waarmee de meting kan worden gevalideerd of waarvan de werking beïnvloed moet worden door interactie met de nieuwe stof. Afhankelijk van de kinetiek en de werkingsduur van de stof kan het experiment worden beëindigd. Dit vindt altijd plaats door het toedienen van een overdosis pentobarbital in de bloedbaan. In veel gevallen wordt ook dan nog met de sensor doorgemeten, omdat toediening van barbituraten ook als een controle kan worden beschouwd. Na afloop van het experiment wordt de sensor zo goed mogelijk vrijgeprepareerd om de locatie van de tip vast te kunnen stellen en eventuele effecten van de sensor op het omliggende tissue te meten. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat de sensor wordt aangebracht. De bloedmonsters worden gebruikt om parallel aan de sensor bepaling een analyse te kunnen doen van de concentratie van de biomarker of de test-stof gebruikt voor de farmacologische beïnvloeding. Tevens wordt in sommige gevallen ook een microdialyse probe aangebracht waarbij de werking van de sensor ook locatie specifiek kan worden gevalideerd op twee niveaus:

- het meten van langere termijn effecten op de biomarker (algemene stijging van de concentratie gemeten met microdialyse, in vergelijking met zeer transiente effecten gemeten met de sensor)
- het meten van de concentratie van de teststof op de testlocatie (kinetiek)

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

Met behulp van een poweranalyse is het benodigde aantal dieren om een relevante statistische toets uit te kunnen voeren bepaald op 6 dieren. Ervaring met deze techniek tot nu toe heeft geleerd dat 72% van de experimenten succesvol kan worden afgerond. Hiervoor zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment, het feit dat deze techniek pas relatief recent is geïntroduceerd, complicaties tijdens de ingreep (waardoor verder meten niet mogelijk was (bijvoorbeeld humaan eindpunt) en het niet kunnen voltooien van het voorgenomen protocol (de periode van toediening + werkingsduur van de test-stof zijn niet volledig afgerond) de belangrijkste oorzaken. Geschatte benodigde aantal dieren per grope is daarom $100\%/72\% \times 6 \text{ dieren} = 8.3 = 9 \text{ dieren}$. Naar verwachting zal het aantal werkelijk benodigde dieren minder zijn omdat het uitval percentage zal in de toekomst zeker verminderen, zie hierover informatie onder D.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doel structuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Geschatte totaal aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar maximaal 20 nieuwe of referentie stoffen te gaan testen. Met een groepsgrootte van 9 dieren per stof zou het om een totaal aantal van 180 dieren gaan.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen. Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. De te gebruiken sensoren hebben vooraf hun werking bewezen (in de ontwikkelingsfase beschreven in dierproef beschrijving 1) en kunnen daarom veilig in-vivo worden toegepast. Verdere verfijning van de experimenten vindt plaats doordat elke sensor voor en na toepassing in-vivo wordt gecalibreerd. Als de sensor bij pre-calibratie niet voldoet aan de kwaliteitseisen zal deze niet worden ingezet in een in-vivo experiment. Anesthesie wordt pas ingeleid nadat een positief resultaat uit de pre-calibratie is behaald. Verfijning zit ook in de wijze van inbrengen van de sensor, door goede overweging van de locatie, het maken van een passend ontwerp voor die locatie en training van de uitvoerende biotechnicus voor de bijbehorende operatieve ingreep kan de experimentele afloop worden geoptimaliseerd. Verfijning/vermindering door het inbrengen van een tweede sonde die die gebruikt kan worden om lokaal de kinetiek van de toegepaste stof te bepalen (of de langere termijn effecten van de teststof) is ook mogelijk, in het verleden zou hiervoor een aparte groep dieren zijn ingezet. Verfijning en vermindering voor dit type experiment is ook mogelijk indien het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode steeds meer gaat lijken op andere standaard experimenten die bij Brains On-Line worden uitgevoerd met een microdialyse sonde, door het meer toepassen van de techniek krijgen medewerkers meer ervaring. Voor microdialyse is het uitval percentage inmiddels gedaald naar een percentage tussen de 15 en 20%.

De geplande experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

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

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van lokale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Op dit moment zijn er voor zover ons bekend geen bedrijven die op commerciële basis in-vivo sensing experimenten uitvoeren waarbij niveaus bovengenoemde neurotransmitter / signaalstoffen worden gemeten. De kans dat bij het testen van een nieuw geneesmiddel dus een duplicatie experiment wordt uitgevoerd is gering. Wel zal in veel gevallen aan het einde van een individueel experiment een bekende blocker, agonist of antagonist worden toegediend. Deze toediening dient voornamelijk om de metingen verder te valideren. Aangezien de toediening plaatsvindt voor of na de toediening van een nieuwe stof of een niet eerder getest vehicle is er geen sprake van een duplicatie.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten, anders dan door nog mogelijk onbekende bijwerkingen van de teststof.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Onvolvoende kennis van het nieuwe geneesmiddel.

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

Voordat een nieuwe stof wordt getest wordt bij de sponsor van een project navraag gedaan over in-vitro en in-vivo studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend. Deze informatie is niet altijd beschikbaar, maar wanneer deze beschikbaar is wordt hij meegenomen in het opstellen van het protocol.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal of matig. Matig ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt (modellen voor hersenaandoeningen zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend een model voor de ziekte van Huntington). Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de sensor op de juiste plaats was geïmplanteerd. Omdat hierbij het tissue rond het implantaat moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Doorontwikkelen van gevalideerde microsensoren"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Doorontwikkeling I: wireless sensing: voor deze experimenten is in eerste instantie ook een deel ex-vivo werk nodig. Hierbij moet worden gedacht aan het vinden van een juiste combinatie van een versterker en zender, die klein genoeg zijn om in proefdieren toegepast te worden, maar krachtig genoeg om een aantal dagen metingen mee te kunnen verrichten / data te verzenden (of eventueel op te slaan). Dergelijke zenders en versterkers zijn voldoende voorhanden, het is van belang om een goede voorselectie te maken. Met de voorgeselecteerde systemen kunnen eerst in-vitro testen worden gedaan voor toepassing in een dier. De toe te passen sensor is gebaseerd op de waterstofperoxide sensor die met een tweede enzymlaag op een specifieke biomarker kan worden toegepast.

Doorontwikkeling II: robuuste sensor: dezelfde waterstofperoxide gebaseerde sensor zal bij lange termijn toepassing (in dieren of mensen) bestand moeten zijn tegen fysieke belasting, maar moet ook worden beschermd tegen biodegradatie en biofouling en ook nog biocompatibel zijn. Voor deze ontwikkeling is het belangrijk om met goede materiaal kennis op zoek te gaan naar materialen die aan deze eisen voldoen. Voor veel materialen is in de literatuur (en uit eerder uitgevoerde proeven intern) al kennis beschikbaar, dus is het van belang om deze kennis te gebruiken. Voor deze toepassing worden de sensoren ook eerst in-vitro getest om te zien of de beoogde resultaten haalbaar zijn alvorens in dieren te gaan meten.

Doorontwikkeling III: lactaatsensor voor toepassing bij tijdens partus in de mens: deze sensor is gebaseerd op de bestaande lactaat sensor Brains On-Line en een in de mens gebruikte sonde voor het meten van electrocardiogrammen. Deze sensor zou op termijn het afnemen van bloed voor een lactaat test bij het nog ongebooren kind kunnen vervangen. Materiaal keuze is ook voor deze toepassing van groot belang voor het uitvoeren van in-vitro experimenten. Na de in-vitro experimenten kan de sensor op dieren toegepast worden.

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

Voor dit type experimenten worden dieren onder anesthesie gebracht (inhalatieanesthesie), en een langwerkend analgeticum toegediend in het geval van bijkomen na de operatie. Op de locatie waar de sensor moet worden ingebracht wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt. Het doelgebied van de sensor wordt toegankelijk gemaakt, ofwel door de vorming van een (sub-cutane) pocket of door het boren van een kleine opening in de dorsale zijde van de schedel. Afhankelijk van de locatie wordt ook gewerkt met een vloeibaar of gelvormig topicaal analgeticum. Nadat voldoende tijd is verstreken voor het locale analgeticum om werkzaam te zijn wordt de sensor ingebracht. Zodra de sensor op de juiste locatie zit wordt deze vastgezet om signaalverstoring door beweging tegen te gaan.

Bij alle geplande doorontwikkelingen is het de bedoeling om de uiteindelijke toepassing te laten plaatsvinden in vrijbewegende (en normaal gedragende) dieren te meten. Dat betekent dat na plaatsen van de sensor de huidopening in het dier moet worden dichtgehecht en dat de dieren rustig moeten bijkomen uit de anesthesie. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, en geen tekenen van ongerief vertonen, anders dan die te verwachten zijn na een dergelijke chirurgische ingreep, kunnen zij worden teruggeplaatst in hun kooi. Indien nodig worden de dieren verzorgd met extra ingeweekt voer en/of solid drink.

Voor de wireless sensing kan het nodig zijn om het dier van een tweede sub-cutane pocket te voorzien waarin de sterile telemetrische zender wordt geplaatst. Bij deze vorm van sensing is het mogelijk om één tot enkele dagen na operatie te beginnen met de metingen. Het dier merkt hiervan niets, aangezien de sensor communiceert met een basisstation dat zich in de buurt van de kooi bevindt. Voor het testen zal één of enkele keren een toediening moeten plaatsvinden om een respons te kunnen bepalen op een test-stof. Deze test-stof (in veel gevallen een referentie stof met bekende werking) moet een relevante farmacologische beïnvloeding van het te bestuderen systeem geven (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend insuline bij het ontwikkelen van een glucose sensor). Na maximaal 10 weken zal het dier wederom onder anesthesie worden gebracht en worden getermineerd, de sensor kan vervolgens worden verwijderd voor post-calibratie en hergebruik van de zender.

Testen van de robuustheid (biologische houdbaarheid) van de sensor zal op vergelijkbare wijze gebeuren. In dit geval kan het zijn dat er gewerkt wordt met een sensor die met bedrading is verbonden. Het dier zal dan gedurende de dag voor enkele uren aan de meetapparatuur worden aangesloten. Hierbij zal de bewegingsvrijheid van het dier niet worden aangetast. Aansluiten zal op meerdere tijdstippen gebeuren over een periode van maximaal 2 maanden. Op deze dagen is het zinvol om de dieren ook een farmacologische behandeling te geven om de werking van de sensor te testen. Aan het einde van de metingen zal het dier onder anesthesie worden getermineerd, en een post-calibratie zal moeten uitwijzen in hoeverre de sensor minder gevoelig is ten opzichte van de gevoeligheid bij aanvang van de experimenten, gezien er wordt gewerkt met biologisch actieve stoffen. Het omringende tissue moet worden gechecked op tekenen van irritatie/inflammatie of inkapseling.

Voor doorontwikkeling III zullen experimenten alleen onder anesthesie worden uitgevoerd zoals beschreven in beschrijving dierproeven 2. Na het meten van een stabiele baseline waarde (dit kan een aantal uren duren) worden één of meer stoffen toegediend en wordt gekeken naar het effect van de toegediende stof of de biomarker concentratie. Afhankelijk van de kinetiek en de werkingsduur van de stof kan het experiment worden beëindigd.

Alle terminaties vinden plaats door het toedienen van een overdosis pentobarbital in de bloedbaan. Na afloop van het experiment wordt de sensor zo goed mogelijk vrijgeprepareerd om de locatie van de tip vast te kunnen stellen en eventuele effecten van de sensor op het omliggende tissue te meten. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat de sensor wordt aangebracht. De bloedmonsters worden gebruikt om parallel aan de sensor bepaling een analyse te kunnen doen van de concentratie van de biomarker of de test-stof gebruikt voor de farmacologische beïnvloeding. Tevens wordt in sommige gevallen ook een microdialyse probe aangebracht waarbij de werking van de sensor ook locatie specifiek kan worden gevalideerd op twee niveaus:

- het meten van langere termijn effecten op de biomarker (algemene stijging van de concentratie gemeten met microdialyse, in vergelijking met zeer transiente effecten gemeten met de sensor)
- het meten van de concentratie van de teststof op de testlocatie (kinetiek)

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

Zoals bij de oorspronkelijke ontwikkeling van de sensoren (uit beschrijving proefdieren deel 1) zullen de resultaten van deze experimenten meer kwalitatief dan kwantitatief van aard zijn. Het gaat hierbij om een proof of principle voor een verfijnd systeem om een meting te kunnen verrichten. Het is van belang om te zien dat een bepaalde sensor reproduceerbaar kan worden ingezet, daarom is een minimum van 3 herhaalde succesvolle experimenten per sensor nodig. In een enkel geval zal een in-vitro geteste sensor in-vivo niet functioneel blijken te zijn, in dat geval zal er een nieuwe sensor moeten worden ontwikkeld in-vitro waarbij door toepassing van andere materialen / constructie / zend apparatuur een beter resultaat wordt behaald. Voor het oorspronkelijke design zullen in een dergelijk geval minder dieren nodig zijn, maar voor het nieuwe design weer 3-5 dieren. Wanneer een bepaald sensor ontwerp effectief lijkt te werken kan het worden ingezet in meer routine matige experimenten zoals beschreven onder proefdier beschrijving 2. Hiervoor zal wel een nieuwe beschrijving proefdieren of zelf een nieuwe aanvraag moeten worden ingediend.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van wild-type (niet transgene) ratten, alleen indien de doorontwikkelde sensoren zich hebben bewezen voor lange termijn metingen in vrijbewegende dieren, is het zinvol om een eventuele aanvraag te schrijven waarin de sensoren worden getest in muizen. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, in alle gevallen zal gebruik worden gemaakt van jong volwassen dieren. Geschatte totaal aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar maximaal 10 kandidaat systemen te vinden waarmee telemetrisch gemeten kan worden. Voor de lange termijn studies zullen meerdere groepen moeten worden getest, tijdpunten van 1, 2, 4 en 8 weken na implantatie, materialen zullen in de regel vooral voor biocompatibiliteit of voor geringe biofouling geschikt zijn, ervan uitgaande dat we tot 3 verschillende materiaal combinaties zouden willen testen gaat het in dit geval om 24 condities. Als laatste verwachten we voor de lactaat sensor met maximaal 4 prototypen in-vivo te willen testen. In totaal dus $(10+24+4) \cdot 38$ groepen met 5 dieren en een slagingspercentage van 80% (gabaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment en complicaties tijdens en na de ingreep de belangrijkste oorzaken) zou het om een totaal aantal van $5 * 38 / 0.8 = 238$ dieren gaan.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

- Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Aangezien de uiteindelijke toepassing van de sensoren is gebaseerd op de wettelijke eis dat nieuwe geneesmiddelen worden getest in levende dieren is het onontkoombaar dat deze experimenten worden uitgevoerd in levende dieren. Vervanging in dit stadium van de experimenten is niet mogelijk aangezien de toepassing van deze sensoren is gericht op fysiologische processen in intacte levende wezens. Het complexe samenspel van de verschillende biomoleculen in het lichaam maken dat verstoringen die niet in de in-vitro test zijn waargenomen toch zorgen voor een verstoring van het signaal. Farmacologische beïnvloeding van de biomarker verschilt vaak ook tussen het intacte wezen en ex-vivo metingen (kinetiek en metabolisering van stoffen). Elk model waarbij dus niet de totale fysiologie van het organisme wordt meegenomen vergroot het risico op falen van het meetsysteem in vervolg stappen. Een telemetrisch systeem waarmee fysiologisch relevante parameters worden gemeten kan alleen zinvol worden getest in een levend dier. Biocompatibiliteit en biofouling is ook alleen goed te testen in een levend dier, als in parallel fysiologische parameters gemeten moeten worden. De perinatale lactaatsensor kan grotendeels ex-vivo worden getest, maar voor toepassing in de humane geneeskunde zal tenminste de werking éénmaal moeten worden gedemonstreerd in levende dieren.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Aan de vermindering van het aantal dieren wordt gewerkt door de uitgebreide voorscreens van de mogelijke sensoren, en het waar mogelijk combineren van de experimenten, aangezien ook bij een telemetrische zender de fysieke belasting al aanwezig zal zijn. Voorscrenen van de juiste systemen en materialen is van groot belang om de toepassing in-vivo zo zinvol mogelijk te kunnen testen. In gevallen waar na drie dieren duidelijk is of de gekozen oplossing in-vivo werkt of niet kan de groepsgrootte tot 3 worden beperkt.

Verfijning van de experimenten vindt plaats doordat elke sensor voor en na toepassing in-vivo wordt gecalibreerd. Als de sensor bij pre-calibratie niet voldoet aan de kwaliteitseisen zal deze niet worden ingezet in een in-vivo experiment. Anesthesie wordt pas ingeleid nadat een positief resultaat uit in-vitro de pre-calibratie is behaald. Verdere verfijning zit in de wijze van inbrengen van de sensor, door goede overweging van de locatie, het maken van een passend ontwerp voor die locatie en training van de uitvoerende biotechnicus voor de bijbehorende operatieve ingreep kan de experimentele afloop worden geoptimaliseerd. Een van de beoogde ontwikkelingen is het maken van een sensor die op zeer vergelijkbare wijze kan worden ingebracht als een microdialyse probe, een techniek waar al vele jaren ervaring mee is. Verdere verfijning zit in de mogelijkheid om in de toekomst te gaan werken aan een algoritme dat de stabilisatie van de sensor kan voorspellen. Hierdoor zal het niet langer nodig zijn om te wachten tot een sensor volledig is gestabiliseerd, maar kan op basis van het algoritme de basislijn worden geëxtrapoleerd, en effecten daarboven worden bepaald.

Verfijning van de protocollen uitgevoerd in het kader van de "biologische houdbaarheid" kan worden gezocht in het tijdig beëindigen van een experiment

waarbij de sensor niet meer functioneel is voor het beoogde einde van het experiment. Door zo kort mogelijk na het uitvallen van de sensor te kijken waardoor deze niet meer werkt zal het meest accurate beeld ontstaan waarop een ontwerp voor een volgende sensor kan worden gebaseerd.

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

Waar mogelijk worden deze experimenten alleen uitgevoerd bij dieren onder anesthesie. Wanneer het toepassing onder wakkere condities nodig is worden dieren dagelijks gemonitord. Hierbij wordt gekeken naar wond-genezing, algemeen herstel na operatie, gewicht van het dier en algemene uiterlijke kenmerken van pijn, lijden of angst. Op basis van tot nu toe uitgevoerde experimenten beperkt ongerief zich tot herstel na de operatie en worden er geen nadelige gevolgen geobserveerd van de aanwezigheid van de sensor. Toegepaste materialen in het kader van de biofouling en biocompatibiliteit worden uitsluitend gebruikt wanneer zij in de literatuur zijn beschreven als geschikte materialen voor humane toepassingen. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Door uitgebreid literatuuronderzoek en bezoek aan internationale bijeenkomsten wordt zorggedragen voor een zo up-to-date mogelijke kennis van het veld. Veel microsensoren worden in-vitro ontwikkeld, maar halen zelden toepassing in-vivo, of blijken bij in-vivo toepassing niet functioneel. Deze kennis levert een grote bron van informatie over mogelijkheden. In een zeer beperkt aantal gevallen zijn sensoren ook in vrij bewegende dieren toegepast, de hier genoemde aandachtspunten zijn ook in de literatuur beschreven, maar tot op heden is er geen complete oplossing gevonden. In zekere zin is hier dan ook sprake van een stuk fundamenteel onderzoek waarbij kennis uit de materiaalkunde, biomechanica en protese geneeskunde kan worden gebruikt om nieuwe oplossingen te vinden voor het maken van een in vrij bewegende dieren en mensen werkende sensor.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Een deel van de metingen zal moeten plaatsvinden op dieren die individueel zijn gehuisvest. Brains On-Line heeft echter een uniek huisvestings-systeem ontwikkeld waarbij dieren visueel, auditief en olfactorisch contact hebben met elkaar, maar elkaar niet fysiek kunnen benaderen. Waar mogelijk zal dit systeem worden toegepast. In het verleden is namelijk gebleken dat de dieren bij elkaar juist op de plaats van het implantaat gaan knagen, dit kan leiden tot onnodige beschadiging van het implantaat.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voor de experimenten onder anesthesie geldt dat deze terminaal zijn en is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten. Dieren die bijkomen na de operatie zullen van het bijkomen en van de operatie zelf stress ondervinden. Pijn die gepaard gaat met het herstel na de uitgevoerde operatie wordt adequaat bestreden met een analgesie protocol. In het geval van langzaam herstel na een zware of langdurige operatie (hier niet voorzien) is het mogelijk om de dieren op basis van een pampering protocol op krachten te laten komen. Het loskomen van de sensor zou gevolgen kunnen hebben voor het welzijn van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het dier zou de wond door aanraking of knagen kunnen openen, of gebruikte lijm (bij een sensor in de hersenen) zou niet bestnad zijn tegen fysieke belasting. Hierdoor zou de sensor los kunnen komen.

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

Voorkomen van wond irritatie door besmetting, plaatsing van de sensor op een fysiek onbereikbare plaats, geen randen/spitse voorwerpen in de kooi. Operaties worden uitgevoerd onder op basis van een standaard aseptiek protocol onder schone condities. De lijmen die worden toegepast worden al sinds jaren toegepast voor het vastzetten van microdialyseprobes.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment. Het loskomen van de sensor, gepaard gaand met grote verwondingen. Algehele slechte conditie van het dier na operatie (scoring op basis van gewicht, vacht, oogkleur en huidskleur en eventueel lichaamstemperatuur). Termineren als de sensor niet meer functioneel is, zodat mogelijk informatie kan worden verkregen over de oorzaak hiervan

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

Minder dan 5%

K. Classificatie van ongerief

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

Matig, alle operatieve ingrepen veroorzaken matig ongerief dat alleen kan worden bestreden maar niet kan worden voorkomen. Uiteraard wordt door toepassing van complete anesthesie en analgesie geprobeerd de gevolgen te minimaliseren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling (met uitzondering van de dieren waarbij wordt gekeken naar lange termijn effecten van de implantatie en de telemetrische sensor). Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de sensor op de juiste plaats was geïmplanteerd en of deze eventueel schade of reactie heeft opgewekt. Omdat hierbij het tissue rond het implantaat moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="4"/> | <input type="text" value="Single cell electrophysiology"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Neuropsychiatrische aandoeningen, waaronder depressie, angst, psychose, verslaving, ziekten van Parkinson, Alzheimer en Huntington, hebben hun oorsprong in het centraal zenuwstelsel en hebben invloed op emotie, cognitie en gedrag van mensen. Een laatste belangrijke groep van aandoeningen zijn de neurodegeneratieve aandoeningen waarbij door afsterven van neuronen naast emotionele en cognitieve ook motorische problemen kunnen optreden. Al deze ziekten van het centraal zenuw stelsel vormen een grote medische uitdaging, naar schatting 25% van de wereldbevolking krijgt te maken met een neurologische aandoening tijdens zijn of haar leven. Volgens de WHO is het de op een na grootste reden voor uitval uit een normaal bestaan in de samenleving in geïndustrialiseerde landen.

Behandelingen voor neurologische aandoeningen zijn 60 jaar geleden begonnen met antidepressiva en antipsychotica. Door intensief onderzoek in de afgelopen 60 jaar zijn efficiëntere en veiligere middelen ontwikkeld met minder bijwerkingen. Drie belangrijke beperkingen van deze geneesmiddelen blijven bestaan: een gebrek aan goede response op therapie, de vertraagde werking van de middelen en het risico op terugval na stoppen van een behandeling. De huidige ontwikkeling van nieuwe farmaca richt zich op deze uitdagingen. Brains On-Line wil de ontwikkeling van nieuwe stoffen voor de kliniek ondersteunen door het aanbieden van onderzoeksplatforms voor nieuwe stoffen, waarbij ze kunnen worden getest tegen bestaande en werkzaam getoonde stoffen.

De hier aangevraagde proeven zijn erop gericht om veranderingen in veldpotentialen rond een individueel neuron op te pikken. Hierbij kunnen frequentie (en patroon), amplitude, lengte van individuele pulsen en of aantallen actief vurende cellen in één doorgang door een hersen gebied worden bepaald. Al deze parameters kunnen beïnvloed worden door farmaca die direct door aangrijpen op een receptor of kanaal, of indirect door dat de farmaca een secundaire transmitter doen vrijkomen die effect heeft. Door gebruik te maken van bekende receptor (ant)agonisten is het mogelijk om niet alleen de werkzaamheid, maar ook het werkingsmechanisme te bepalen. Ook is het mogelijk om parameters voor receptorbindings affiniteit te bepalen.

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

Dieren worden voor het experiment onder diepe, langdurige anesthesie gebracht (eventueel aangevuld met een analgeticum, wanneer deze pijler niet geborgd is door het anestheticum), afhankelijk van het neurotransmitter systeem dat zal worden bestudeerd wordt hiervoor inhalatie of een injectie anesthesie gebruikt. Daarna wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt op de schedel boven het hersengebied van interesse. Lokaal wordt analgesie toegepast voordat de schedel wordt vrijgeprepareerd en op de juiste plaats een klein gat wordt geboord waardoor de glazen electrode kan worden ingebracht. Terwijl het locale anestheticum kan inwerken worden er indien nodig voor verdere anesthesie of toediening van test-stoffen kanules in de staartvene, intraperitoneale ruimte, ventriculair of subcutaan ingebracht. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat er gaten in de schedel worden geboord. De bloedmonsters worden gebruikt om een analyse te kunnen doen van de concentratie van de de test-stof in het bloed. Als alle voorbereidingen zijn voltrokken wordt het dier in een stereotactisch frame geplaatst ter voorbereiding op de metingen. De schedel van het dier wordt verbonden met de aarding van de meetapparatuur te verbinden, zodat alle gemeten potentialen worden gemeten ten opzichte van één en dezelfde nulwaarde. Het frame wordt gebruikt om in het gebied van interesse (waarvan de coördinaten zijn gebaseerd op een hersenatlas) een glazen pipet te laten zakken in de hersenen. De glazen pipet heeft een tipdiameter van enkele micrometers. Op de juiste diepte kunnen de elektrische ontladingen van neuronen worden gemeten. Op basis van ervaring en literatuur is het mogelijk om specifieke cellen te herkennen en de meting te starten.

Afhankelijk van de vraagstelling kan worden gekozen voor een farmacologische dose-finding of een cells per trackt design. Bij een dose-finding experiment wordt van één cel de basale vuurfrequentie bepaald en vervolgens de invloed van verschillende toedieningen van de te bestuderen stof (tegen een ziekte van het centraal zenuwstelsel (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een potentieel antipsychoticum, antidepressivum), al dan niet in combinatie met een voor of na behandeling met een bekende (ant)agonist, om het werkingsmechanisme van de stof of het celtype te valideren. Bij een ander type vraagstelling kan de electrode langzaam door het gebied van interesse worden geleid, waarbij het patroon van de potentialen wordt bepaald. In dergelijke gevallen zal het dier vaak worden voorbehandeld met een nieuwe test stof tegen een ziekte van het centraal zenuwstelsel (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een potentieel antipsychoticum, antidepressivum). Hierbij moeten dan ook controle experimenten met bekende stoffen en een vehicle worden meegenomen.

Nadat de informatie ten behoeve van het experiment compleet is wordt het dier getermineerd door een overdosis pentobarbital. De meting loopt ook dan door, omdat het vuren van de cel binnen korte tijd na het stoppen van het hart ook zou moeten stoppen. Het dier wordt ten alle tijden warm gehouden op een warmtemat en temperatuur regelmatig gecontroleerd. Vochtverlies door ademhaling en de aanwezigheid van een operatie wond op het hoofd wordt gecompenseerd door regelmatige toediening van subcutaan saline.

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

Op basis van een poweranalyse is de benodigde groepsgrootte berekend op 6 dieren, met een uitval van 25-30% (gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment, complicaties tijdens de ingreep en het niet kunnen voltooien van het voorgenomen protocol (de periode van toediening + werkingsduur van de test-stof zijn niet volledig afgerond) de belangrijkste oorzaken) is de praktijk dat 8 dieren voor elke te testen stof dosering nodig zijn. Het minimaliseren van het aantal dieren is vooral mogelijk door de uitval tijdens de experimenten te minimaliseren. Een andere belangrijke keuze is het te testen aantal doseringen, door deze te minimaliseren kan het aantal experimenten worden beperkt.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doel structuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Geschatte totaal aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar rond de 25 nieuwe of referentie stoffen te gaan testen. Op basis van het aantal dieren gebruikt in de afgelopen 5 jaar (208) verwachten wij dat we maximaal 250 dieren nodig hebben voor deze experimenten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen. Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt. Een klein deel van de experimenten zou vervangen kunnen worden door het uitvoeren van patch-clamp experimenten op individuele cellen die zijn verkregen uit een recent getermineerd dier. Op deze cellen is een deel van de werking van de test stof uit te zoeken, maar het geeft nog geen informatie over de dosering die in het intacte dier (en later de mens) nodig is om het beoogde effect te verkrijgen.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Verfijning van deze experimenten is voornamelijk gericht op het lang stabiel onder anesthesie houden van de dieren, daarbij moet aandacht worden besteed aan lichaamstemperatuur, vochthuishouding en ademhaling (sfrequentie). Het voorbereiden van goede electrodes voor de experimenten en het regelmatig checken van de apparatuur is van groot belang om zeker te zijn dat de individuele experimenten op een goede manier plaatsvinden.

Vermindering voor dit type experiment is mogelijk indien het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode steeds meer routinematig wordt toegepast bij Brains On-Line.

Net als bij dierproef beschrijving 2 worden deze experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

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

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van locale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Door goede literatuur kennis over bestaande mechanismen en experimenten is het goed mogelijk om te voorkomen dat experimenten nodeloos worden gedupliceerd. In een enkel geval zal het nodig zijn om experimenten te herhalen om een methode te valideren alvorens deze in te zetten voor het testen van nieuwe geneesmiddelen. Bijkomend voordeel van de literatuuronderzoeken is dat nieuwe methoden die verfijning of vermindering kunnen ondersteunen worden herkend. De te testen nieuwe geneesmiddelen zijn in de meeste gevallen niet eerder in electrofysiologische experimenten getest, onderzoekspartners komen juist naar ons toe omdat dergelijke expertise daar niet in-huis beschikbaar is. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat experimenten duplicaties zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten. Belangrijkste uitdaging is eventuele overgang tussen inhalatie anesthesie en injectie anesthesie. Hierbij moet zeer zorgvuldig worden gemonitord dat dieren niet te ver uit narcose komen of te diep in de narcose wegzakken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Over- of onderdosering van anestheticum

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

Ervaring van de uitvoerende medewerker en goede directe monitoring van de ademhaling van het dier en het zorgen voor de aanwezigheid van apparatuur voor beademing en monitoring van de zuurstofsaturatie van het bloed.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal of matig. Matig ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt (modellen voor hersenaandoeningen zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend een model voor de ziekte van Huntington). Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de electrode op de juiste plaats was geïmplanteerd in de hersenen, deze moeten dus na het experiment worden verwijderd. Voor de genetische gemodificeerde dieren geldt dat ook een stukje weefsel moet worden bewaard voor genotypering.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 5 | Long Term Potentiation / Long Term Depression |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Single-cell electrofysiologie (beschrijving dierproeven 4) is een methode om direct actie-potentialen van actief vurende neuronen te meten. Het meten van veldpotentialen van een cel populatie kan worden gebruikt om synaptische potentialen en de synaptische plasticiteit te meten. Voor het meten van effecten van potentiering is het van belang om het potentiaal te meten van een groot aantal cellen in een bepaald hersengebied. Door de potentialen te synchroniseren met een stimulus met een specifieke frequentie is het mogelijk om deze "groepspotentialen" te meten (population spike or population synaptic potential). Het gemeten signaal wordt ook wel EPSP genoemd (evoked population synaptic potential). Herhaling van de stimulatie kan lijden tot een vergroting of verkleining van de amplitude van de EPSP (respectievelijk: long term potentiation en long term depression) en is een maat voor synaptische

plasticiteit en onderliggende mechanismen voor geheugen en cognitie betrokken bij pathofysiologie en behandeling van cognitieve deficienties bij ouderdoms-ziekten, verslaving en neuropsychiatrische aandoeningen.

Doel van dit type experimenten is het testen van het effect van nieuwe geneesmiddelen op de 'long term potentiation' of 'depression'. Deze stoffen kunnen op deze manier worden getest op de versterking van cognitieve processen.

Zo hebben wij in het recente verleden de disruptie van LTP door scopolamine gevalideerd (deze stof is zowel in gedragstesten als in eerdere electrofysiologische testen bewezen als cognitie onderdrukkend) in ratten. Omgekeerd kan deze methode ook worden gebruikt om stoffen te testen die de cognitie versterken. Afhankelijk van de pre-synaptische stimulatie (frequentie en amplitude) zullen de post-synaptische potentialen worden geactiveerd, aanwezigheid van de cognitie versterkende of remmende stoffen zal de respons op de stimulatie gaan variëren.

In een typische studie zal worden gekeken naar het effect van een potentieel nieuw geneesmiddel alleen en in combinatie met een disrumperende stof zoals scopolamine (om te kijken of de disruptie kan worden omgekeerd). Daarnaast moeten passende controle experimenten worden uitgevoerd.

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

Dieren worden voor het experiment onder diepe, langdurige anesthesie gebracht (eventueel aangevuld met een analgeticum, wanneer deze pijler niet geborgd is door het anestheticum), afhankelijk van het pathway dat zal worden bestudeerd wordt hiervoor inhalatie of een injectie anesthesie gebruikt. Diepe anesthesie wordt geconstateerd met afwezigheid van voet of cornea reflex. Daarna wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt op de schedel boven het hersengebied van interesse. Lokaal wordt analgesie toegepast voordat de schedel wordt vrijgeprepareerd en op de juiste plaats een klein gat wordt geboord waardoor de glazen electrode kan worden ingebracht.

Terwijl het lokale anestheticum kan inwerken worden er indien nodig voor verdere anesthesie of toediening van test-stoffen kanules in de staartvene, intraperitoneale ruimte, ventriculair of subcutaan ingebracht. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat er gaten in de schedel worden geboord. De bloedmonsters worden gebruikt om een analyse te kunnen doen van de concentratie van de de test-stof in het bloed. Als alle voorbereidingen zijn voltrokken wordt het dier in een stereotactisch frame geplaatst ter voorbereiding op de metingen. Op basis van schedel-orientatie punten (bregma/lambda) worden kleine openingen in de dorsale zijde van de schedel geboord boven specifieke hersengebieden op basis van een hersenatlas. De schedel van het dier wordt verbonden met de aarding van de meetapparatuur te verbinden, zodat alle gemeten potentialen worden gemeten ten opzichte van één en dezelfde nulwaarde.

Het dier wordt in het stereotactisch frame geplaatst en de stimulatie electrode(s) en de meetelectrode worden geïmplanteerd in de gebieden van interesse, de definitieve locatie wordt bepaald op basis van de response op de stimulatie(s). Als de juiste condities zijn vastgesteld waaronder de metingen kunnen plaatsvinden, worden de electrodes op hun plaats gelijmd met cyanoacrylaat lijm gevolgd door tandarts cement (voor de stabiliteit en afscherming van elektrische ruis). Hierna worden baseline EPSPs gemeten, verdere EPSPs worden gemeten na een korte applicatie van stimulatie met een specifieke frequentie. De effecten van plasticiteit modulerende geneesmiddelen (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend pro-cognitive stoffen) toegedient voor of tijdens de experimenten kunnen gemeten worden in vergelijking met een controle groep (vehicle toediening). De methode kan onder andere ook worden toegepast om van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen bijvoorbeeld ziektes van het centraal zenuw stelsel aan te tonen dat zij geen negatieve gevolgen hebben voor de plasticiteit. Eventueel kan gekozen worden voor meting van het effect op een LTP disrumperend of versterkend agens. Toedieningsroute: lokaal, i.v., i.p., s.c., i.c.v. of oraal.

Dieren worden tijdens de anesthesie inductie en het experiment warm gehouden op een warmtematje. Temperatuur, ademhaling(frequentie) en zuurstofsaturatie van het bloed worden regelmatig gecontroleerd. Tevens worden de dieren op regelmatige basis subcutaan saline toegediend om

dehydratatie te voorkomen.

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

Op basis van literatuurstudies, en power-analyses is voor een succesvol vergelijk bepaald dat bij deze experimenten 5 succesvolle metingen per groep nodig zijn. Met een een slagingspercentage van 80% (gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de plaatsing en het lijmen van de electrode tijdens het experiment en complicaties tijdens de ingreep de belangrijkste oorzaken) is een groepsgrootte van 6-7 te verwachten. De experimenten duren steeds één volledige dag en kunnen in diezelfde dag worden geëvalueerd. Daarmee kan per dag worden bepaald of verdere dieren nodig zijn om een relevante meting te doen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doel structuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt mits wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Geschatte totaal aantallen: Uitgaande van 1-2 complete experimenten van 4 groepen van ieder 7 dieren per jaar. verwachten wij maximaal $10 \times 28 = 280$ dieren te gaan gebruiken over de periode van de aanvraag.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen (wettelijke eis). Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Verfijning van deze experimenten is voornamelijk gericht op het lang stabiel onder anesthesie houden van de dieren, daarbij moet aandacht worden besteed aan lichaamstemperatuur, vochthuishouding en ademhaling (sfrequentie). Het uitvoeren van de experimenten moet met de grootst mogelijke nauwkeurigheid plaatsvinden. Om onze kennis en kunde op peil te houden werken wij samen met één van de leidende academische instituten (Prof. M. Rowan) in het veld en hebben daar ook training ontvangen. Het voorbereiden van goede elektroden voor de experimenten en het regelmatig checken van de apparatuur is van groot belang om zeker te zijn dat de individuele experimenten op een goede manier plaatsvinden. Na plaatsing van de elektrode wordt vaak ook nog een stabiliteitstest uitgevoerd van 30 minuten, om zeker te zijn dat de elektrode op de juiste plaats wordt vastgelijmd.

Vermindering voor dit type experiment is mogelijk indien het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode steeds meer routinematig wordt toegepast bij Brains On-Line. Daarnaast biedt het dagelijks uitwerken van de data de mogelijkheid om te kijken of verdere experimenten nodig en zinvol zijn. Het gebruik van hetzelfde vehicle in verschillende experimenten biedt ook een mogelijkheid tot reductie.

Net als bij de beschrijvingen voor proeven 2 en 4 worden deze experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

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

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van locale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Door goede literatuur kennis over bestaande mechanismen en experimenten is het goed mogelijk om te voorkomen dat experimenten nodeloos worden gedupliceerd. In een enkel geval zal het nodig zijn om experimenten te herhalen om een methode te valideren alvorens deze in te zetten voor het testen van nieuwe geneesmiddelen. Bijkomend voordeel van de literatuuronderzoeken is dat nieuwe methoden die verfijning of vermindering kunnen ondersteunen worden herkend. De te testen nieuwe geneesmiddelen zijn in de meeste gevallen niet eerder in electrofysiologische experimenten getest, onderzoekspartners komen juist naar ons toe omdat dergelijke expertise daar niet in-huis beschikbaar is. Brains On-Line is voor zover wij weten de enige service provider wereldwijd die dit type experimenten in levende dieren kan doen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat experimenten duplicaties zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten, anders dan door nog mogelijk onbekende bijwerkingen van de teststof.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Onvolvoende kennis van het nieuwe geneesmiddel.

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

Voordat een nieuwe stof wordt getest wordt bij de sponsor van een project navraag gedaan over in-vitro en in-vivo studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend. Deze informatie is niet altijd beschikbaar, maar wanneer deze beschikbaar is wordt hij meegenomen in het opstellen van het protocol.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%.

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal of matig. Matig ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt (modellen voor hersenaandoeningen zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend een model voor de ziekte van Huntington). Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de electrodes op de juiste plaats was geïmplanteerd. Omdat hierbij de hersenen moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="6"/> | <input type="text" value="Spinal cord electrophysiology en electromyography"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Pijn is een klacht waar miljoenen mensen in de wereld mee moeten leven. Volgens het Center for Disease Control and Prevention (U.S.A.) zijn chronische en inflammatoire pijn de belangrijkste oorzaken van invaliditeit in de Verenigde staten. Chronische pijn komt (inclusief neuropathische pijn) komt voor in bijna 90% van patiënten met kanker en kan in veel gevallen niet adequaat behandeld worden. Oorzaken van neuropathische pijn zijn onder andere: diabetische neuropathie, zenuw beknellings syndromen, hersenbloedingen, multiple sclerose en schade aan het ruggemerk na bijvoorbeeld een operatie. Naast neuropathische pijn speelt het ruggemerk een belangrijke rol in neurotransmissie van motor signalen. Deze signalen worden verstoord bij een groot aantal aandoeningen waaronder ook neurodegeneratieve ziekten (zowel centraal als perifeer). Electromyografie (EMG) studies zijn van groot belang, omdat

ze ook in de kliniek worden toegepast en daarmee de vertaalslag van dit type experimenten vrij groot is. De toegepaste techniek voor metingen van elektrische signalen in het ruggemerg en de motorneuronen is gelijk aan die voor het meten van single-cell activiteit in de hersenen, alleen het gebied waar de electrodes worden ingebracht is niet in de hersenen gelegen. Metingen vinden plaats in de lumbaal regio van de ruggegraat of aan de nervus ischiadicus of een van de vertakkingen daarvan.

Electromyografische metingen worden geïnitieerd door een (elektrische) stimulus van de betrokken zenuwbaan, waarna signalen kunnen worden versterkt en gemeten. Belangrijke parameters als bij de single-cell metingen zijn: amplitude, frequentie (burst) karakter, lengte van individuele pulsen, interval tussen potentialen. Deze parameters kunnen door farmaca, ziekte of fysieke schade worden veranderd. In ons model is het mogelijk deze verandering te meten, maar ook of deze veranderingen door toediening van (nieuw) ontwikkelde geneesmiddelen verminderd kunnen worden of zelfs teniet gedaan kunnen worden. Door gebruik te maken van bekende receptor (ant)agonisten is het mogelijk om niet alleen de werkzaamheid, maar ook het werkingsmechanisme te bepalen. Ook is het mogelijk om parameters voor receptorbindings affiniteit te bepalen.

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

Dieren worden voor het experiment onder diepe, langdurige anesthesie gebracht (eventueel aangevuld met een analgeticum, wanneer deze pijler niet geborgd is door het anestheticum), afhankelijk van het pathway dat zal worden bestudeerd, wordt hiervoor inhalatie of een injectie anesthesie gebruikt. Diepe anesthesie wordt geconstateerd met afwezigheid van voet of cornea reflex. De rug van het dier of de achterpoot wordt geschoren en lokaal wordt analgesie toegepast. Op de plaats waar de electrode(s) moeten worden ingebracht, wordt de huid geopend.

Voor de ruggengraat worden de spieren van het doornuitsteeksel verwijderd en vervolgens wordt met een tang voorzichtig het doornuitsteeksel en de wervelboog verwijderd (laminectomie). Op deze wijze worden de zenuwbanen in het ruggemerg toegankelijk. Een stimulatie electrode en een meetelectrode worden vervolgens op verschillende locaties ingebracht. Door het geven van verschillende stimulerie (somatosensorisch, chemisch of elektrisch) kunnen nu de reacties van individuele cellen in de dorsale hoorn van het ruggemerg gemeten worden. De verschillende cellen kunnen reageren op verschillende stimulerie en worden zo geclassificeerd (lage drempel waarde, hoge drempelwaarde of wide dynamic range neuronen). Afhankelijk van de vraagstelling voor de verschillende te testen geneesmiddelen kan een cel van een van deze categorieën worden gekozen om verder te meten. Van deze cel wordt de vuurfrequentie/amplitude/burst patronen en individuele depolarisatie lengte gemeten, en gekeken welke invloed een te testen geneesmiddel hierop heeft. De test-stoffen zijn onder andere, maar uitsluitend: potentiële pijnstillers, inflammatie remmers of neuroprotectieve stoffen. Bijvoorbeeld kan er gekeken worden naar de vuurfrequentie van de wide dynamic range neuronen in reactie op een formaline injectie in de achterpoot als een model voor inflammatoire pijn. Er kan worden getest of nieuwe potentiële pijnstillers deze stimuleries remmen. Toedieningsroute van de test stof: lokaal, i.v., i.p., s.c. of oraal.

Voor de EMG metingen wordt het bovenbeen van het dier vrij geprepareerd, tot het mogelijk is om een stimulatie electrode aan te brengen op de nervus tibialis. en een intramusculaire recording electrode wordt ingebracht in de plantaris spieren voor de EMG (Ho and Waite, 2002; Schwarz et al., 1995; et al.). Zodra de electrodes geplaatst zijn kan na stimulerie worden gekeken naar de tijd tussen de Hoffmann reflex (via het ruggemerg) en de veel snellere directe M reflex (gemeten zeer kort op de stimulerie). Afhankelijk van chemische of fysieke beïnvloeding kan deze tijd langer of korter worden. Door toedienen van potentiële geneesmiddelen kan dit effect worden omgekeerd. Deze geneesmiddelen zouden bijvoorbeeld potentiële pijnstillers, inflammatie remmers of neuroprotectieve stoffen kunnen zijn. Naast het meten van de effectiviteit kan ook de farmacokinetiek worden bepaald: op welk moment na toediening is de dosis effectief. Dit kan worden versterkt door gelijktijdig een bloedmonster (via een onder anesthesie geplaatste catheter) te nemen waarin de concentratie van het geneesmiddel kan worden bepaald.

Alle dieren worden tijdens de anesthesie inductie en het experiment warm gehouden op een warmtematje. Temperatuur, ademhaling (sfrequentie) en zuurstofsaturatie van het bloed worden regelmatig gecontroleerd. Tevens worden de dieren op regelmatige basis subcutaan saline toegediend om dehydratie te voorkomen.

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

Op basis van een power-analyses is de berekende groeps-grootte 6 dieren. Met een een slagingspercentage van 70% (gabaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen, het feit dat deze technieken pas recent zijn geïntroduceerd en complicaties tijdens de ingreep (waardoor verder meten niet mogelijk was bijvoorbeeld humaan eindpunt) de belangrijkste oorzaken zou de groepsgrootte 8 dieren moeten zijn voor elke te testen dosering van een stof. Wanneer deze experimenten meer routinematig worden verwacht wij dat het slagingspercentage zal stijgen tot 80-85% zoals bij andere experimenten.

Het minimaliseren van het aantal dieren is vooral mogelijk door de uitval tijdens de experimenten te minimaliseren. Een andere belangrijke keuze is het te testen aantal doseringen, door deze te minimaliseren kan het aantal experimenten worden beperkt. De experimenten duren steeds één volledige dag en kunnen in diezelfde dag worden geëvalueerd. Daarmee kan per dag worden bepaald of verdere dieren nodig zijn om een relevante meting te doen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt alleen gebruik gemaakt van ratten in verband met de grootte van de te testen structuren. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Naast modellen voor neurodegeneratie de volgende modellen mogelijk ook interessant om te testen met de hier beschreven protocollen.

Inflammatoire pijn: er zijn verschillende vormen van acute en chronische neurologische pijn. Voor deze studies is er echter maar één echt geschikt model en dat is voor acute inflammatoire pijn, geïnduceerd door toediening van een kleine hoeveelheid stof (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend formaline of capseïsin) of fysieke prikkeling van de voetzool (met bijvoorbeeld een van Freij element).

Het bestuderen van de H en M reflexen kan tevens een interessante toepassing zijn voor onderzoek naar geneesmiddelen tegen multiple sclerose of andere aandoeningen van motorneuronen. Voor multiple sclerose bestaat een klassiek model: experimental autoimmune encephalomyelitis. Dit model past ons inziens niet binnen de gestelde grenzen voor ongerief en zal dus niet worden toegepast. Wel zijn er op dit moment (induceerbare) genetische modellen beschikbaar voor dit type onderzoek.

Geschatte totaal aantallen: Uitgaande van 1 experiment voor spinal en 1 voor EMG per jaar voor 1 stof met 3 doseringen en een vehicle verwachten wij maximaal $2 \times 4 \times 8 \times 5 = 320$ dieren te gaan gebruiken over de periode van de aanvraag.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen (wettelijke eis). Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen, het ruggemerg en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt. Complexe structuren met veel interacties tussen cellen zoals deze in het ruggemerg voorkomen zijn vrijwel niet met celkweek te modelleren. Wij houden vorderingen in dit veld met veel interesse in de gaten om waar mogelijk in te toekomst wel met dergelijke modellen te kunnen gaan werken.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Verfijning van deze experimenten is voornamelijk gericht op het lang stabiel onder anesthesie houden van de dieren, daarbij moet aandacht worden besteed aan lichaamstemperatuur, vochthuishouding en ademhaling (sfrequentie). Het uitvoeren van de experimenten moet met de grootst mogelijke nauwkeurigheid plaatsvinden. Om onze kennis en kunde op peil te houden werken wij voor de

laminectomie experimenten samen met één van de leidende academische instituten (Dr. R. Deumens) in het veld en hebben daar ook training ontvangen. Het voorbereiden van goede elektroden voor de experimenten en het regelmatig checken van de apparatuur is van groot belang om zeker te zijn dat de individuele experimenten op een goede manier plaatsvinden. Voor een aantal van de geplande experimenten zou het ook mogelijk kunnen zijn om gebruik te maken van ex-vivo preparaten van de zenuwbanen met het omliggende tissue. In dat geval kan het dier worden getermineerd na uitname van de zenuwbanen en voor aanvang van toediening van teststoffen. In zekere zin zou deze werkwijze ook tot vermindering kunnen leiden, omdat het aantal proeven per dier kan worden vergroot als bijvoorbeeld beide bovenbeenspieren met zenuwbanen worden gebruikt.

Net als bij de andere dierproefbeschrijvingen worden deze experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

Vermindering voor dit type experiment is mogelijk wanneer het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode meer routinematig zal worden toegepast bij Brains On-Line. Daarnaast biedt het dagelijks uitwerken van de data de mogelijkheid om te kijken of verdere experimenten nodig en zinvol zijn. Het gebruik van hetzelfde vehicle in verschillende experimenten biedt ook een mogelijkheid tot reductie.

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

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van algehele en lokale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Door goede literatuur kennis over bestaande mechanismen en experimenten is het goed mogelijk om te voorkomen dat experimenten nodeloos worden geduplicateerd. In een enkel geval zal het nodig zijn om experimenten te herhalen om een methode te valideren alvorens deze in te zetten voor het testen van nieuwe geneesmiddelen. Bijkomend voordeel van de literatuuronderzoeken is dat nieuwe methoden die verfijning of vermindering kunnen ondersteunen worden herkend. De te testen nieuwe geneesmiddelen zijn in de meeste gevallen niet eerder in electrofysiologische experimenten getest, onderzoekspartners komen juist naar ons toe omdat dergelijke expertise daar niet in-huis beschikbaar is. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat experimenten duplicaties zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer

de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten, anders dan door nog mogelijk onbekende bijwerkingen van de teststof.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Onvoldoende kennis van het nieuwe geneesmiddel.

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

Voordat een nieuwe stof wordt getest wordt bij de sponsor van een project navraag gedaan over in-vitro en in-vivo studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend. Deze informatie is niet altijd beschikbaar, maar wanneer deze beschikbaar is wordt hij meegenomen in het opstellen van het protocol.

J. Humane eindpunten

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

dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Gering 1-5%, dit percentage zal afnemen naar mate de experimenten meer routinematig worden uitgevoerd.

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal, gering of matig. Gering ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van acute stimulie onder anesthesie die moeten dienen als model voor pijn. Matig ongerief wanneer gebruik zou worden gemaakt van een genetisch model voor neurodegeneratie (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een model voor multiple sclerose) waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt. Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie na een laminectomie of het vrijprepareren van een spier levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de electrodes op de juiste plaats was geïmplanteerd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 26 juni 2015 10:08
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: DEC advies nieuw project [REDACTED]
Bijlagen: 1_beschrijving_dierproeven_microsensor ontwikkeling_20150529.pdf; 2_beschrijving_dierproeven_microsensor_20150616.pdf; 3_beschrijving_dierproeven_microsensor innovatie_20150529.pdf; 4_beschrijving_dierproeven_single cell_20150616.pdf; 5_beschrijving_dierproeven_LTP_20150616.pdf; 6_beschrijving_dierproeven_spinal_HenM_20150616.pdf; DEC advies Brains On-line 8012 260615.docx; format_projectvoorstel_sensor_e-phys_20150609.pdf; NTS sensor e-phys_20150609.pdf

Categorieën: [REDACTED]

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project ([REDACTED]) van Brains On-line.

Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlages, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is door Brains On-line per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens de DEC-RuG,

[REDACTED]

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code **8012**)
2. Titel van het project: **Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.**
3. Titel van de NTS: **Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:

-naam **DEC-RUG**

-telefoonnummer contactpersoon **[REDACTED]**

-mailadres contactpersoon **[REDACTED]**

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC **12-05-2015**
 - aanvraag compleet **12-05-2015**
 - in vergadering besproken **21-05-2015**
 - anderszins behandeld: **01-06-2015, 03-06-2015, 18-06-2015**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **26-30 Mei 2015, 4-17 Juni 2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **30-05-2015, 17-06-2015**
 - advies aan CCD **26-06-2015**

7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **26-05-2015, 01-06-2015, 04-06-2015**
- Strekking van de vraag / vragen

Vraag omtrent te testen farmaca (welke groepen van farmaca), statistiek (verduidelijking gebruikte gegevens) en gebruik pathologie modellen (welke, ongerief)

- Datum antwoord **30-05-2015, 01-06-2015, 17-06-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en)

Farmaca: met name stoffen met een rol in het centraal zenuw stelsel, in een enkel geval stoffen met een target daarbuiten.

Welke stoffen exact: afhankelijk van de vraag van de klant.

Statistiek is aangevuld met gegevens. Pathologiemodellen verduidelijkt: over het algemeen modellen ziekte van Huntington, Alzheimer en Parkinson, passend binnen de ongerief classificatie van de aanvraag. Standard Operating Procedures (SOP's) zijn hiervoor beschikbaar.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. 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
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een melding / een wijziging op een bestaande vergunning: **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent/**bevoegd** om hierover te adviseren: **ja; de DEC-RuG treedt ook op voor de vergunninghouder Brains On-line**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
 - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
 - wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een essentieel / substantieel / reëel / beperkt belang: **substantieel belang/reëel belang. Dit oordeel is gebaseerd op het belang van het testen van potentieel nieuwe stoffen met de beschreven technieken. De DEC kent op dit moment niet de te testen stoffen en kan dus niet aangeven wat daarvan het belang is.**
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **Brains On-line is deskundig en zeer ervaren in het screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen met de in het protocol beschreven technieken en heeft daarvoor uitgebreide protocollen die kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen**

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **het grootste deel van de beschreven experimenten vindt onder volledige anesthesie plaats en is terminaal; bij een klein deel is er matig ongerief. Het ongerief is realistisch ingeschat**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen. Bij de ontwikkeling van nieuwe sensoren is er een voorfase in vitro. De eigenlijke experimenten moeten in dieren plaatsvinden.**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt . **Het uiteindelijke aantal dieren zal afhangen van de aantallen te testen stoffen; per onderdeel/techniek is duidelijk aangegeven om hoeveel dieren het zal gaan. Er is een voldoende statistische onderbouwing van de aantallen.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Het grootste deel van de experimenten is terminaal met daarbij telkens optimale anesthesie en analgesie protocollen. Bij de experimenten waarbij in wakkere dieren wordt gemeten wordt zo veel als mogelijk gestreefd naar verfijning en is er een adequate welzijnsbewaking. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. Op sommige plaatsen in de protocollen wordt gesproken van pathologiemodellen. Na vragen is dit punt verduidelijkt: dit zijn over het algemeen modellen van ziekte van Huntington, Alzheimer en Parkinson, passend binnen de ongerief classificatie van de aanvraag. Standard operating procedures (SOP's) zijn hiervoor beschikbaar.**

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

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren, de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu. De DEC kent niet de precieze aard van de te testen stoffen; het belang moet daarom afgeleid worden uit de algemene setting van het onderzoek en is naar het oordeel van de DEC in te schatten als reëel/substantieel. **De DEC vindt daarom dat het met het project beoogde belang van een goede screening van potentieel nieuwe medicijnen en de ontwikkeling van nieuwe biosensoren opwegen tegen het ongerief dat de dieren ondervinden. De DEC neemt hierbij mede in overweging dat de onderzoekers hebben aangetoond het streven naar de 3 V's in praktijk te brengen.**

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.
De pathologie modellen mogen niet meer dan matig ongerief geven
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt
Dit besluit is unaniem door de DEC genomen

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 29 juni 2015 16:46
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Ontvangstbevestiging
Bijlagen: ontvangstbevestiging aanvraag AVD247002015156.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij zenden wij u per mail een ontvangstbevestiging AVD/247002015156:"Electro (chemische) afleiding van biologische markers en farmacologisch beïnvloeding".

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line B.V.

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD247002015156

Bijlagen

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD247002015156. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 24700
Naam instelling of organisatie: Brains-On-Line B.V.
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 2094724
Straat en huisnummer: De Mudden 16
Postcode en plaats: 9747 AW GRONINGEN
IBAN: NL59INGB0681766174
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Brains-On-Line B.V.

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 15 juni 2015
Geplande einddatum: 15 juni 2020
Titel project: Electro (chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.
Titel niet-technische samenvatting: Testen van geneesmiddelen met behulp biologische en elektronisch sensoren
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: [REDACTED] Groningen
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies
 en nog 5 beschrijvingen

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Groningen
Datum: 26 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line B.V.

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD247002015156

Bijlagen

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 29 juni 2015

Vervaldatum: 29 juli 2015

Factuurnummer: 201570156

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD247002015156	€ 741,00

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

[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 16 juli 2015 16:24
Aan: [Redacted]
Onderwerp: Aanvullende informatie bij aanvraag AVD247002015156 (uw referentie 8012)

Geachte heer [Redacted]

Op 26 juni heeft de DEC-RUG advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding'.

In de bijlages beschrijving dierproeven is het gebruik van ratten en muizen beschreven. Er wordt niet vermeld of er sprake is van beide geslachten of een geslacht. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Daarom zou de CCD graag willen weten of dit besproken is in de DEC vergadering.

Indien u deze informatie niet bekend is, zullen we na u reactie met de aanvrager contact opnemen met dezelfde vraag.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk maandag, 20 juli 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk bedankt voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 21 juli 2015 21:42
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD247002015156

Excuus,

Ik zie nu bij herlezen dat indienen per netftp mogelijk is. Moet ik dan ook het "melding bijlagen" formulier mee sturen?

Dank,
[REDACTED]



[REDACTED]
Brains On-Line B.V.
P.O. Box 4030
9701 EA Groningen
The Netherlands

Tel.: +31 (0)50 317 1440
Fax: +31 (0)50 317 1449
info@brains-online.com

[REDACTED]
BIC
IBAN [REDACTED]

VAT N
Trade
www.k

CONFIDENTIALITY NOTICE: This e-mail message from Brains On-Line (including all attachments) is for the sole use of the intended recipient(s) and may contain confidential and privileged information. Any unauthorized review, use, disclosure, copying or distribution is strictly prohibited. If you are not the intended recipient, please contact the sender by reply e-mail and destroy all copies of the original message. E-mail is susceptible to data corruption, interception, unauthorized amendment, tampering and viruses, and we only send and receive e-mails on the basis that we are not liable for any such corruption, interception, amendment, tampering or viruses or any consequences thereof.

From: [REDACTED]
Sent: 21 July 2015 21:34
To: 'Info-zbo'
Subject: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD247002015156

Beste [REDACTED]

Kan ik ook elektronisch reageren via het ftp systeem, of per mail?

Dank
[REDACTED]



[Redacted]

Brains On-Line B.V.
P.O. Box 4030
9701 EA Groningen
The Netherlands

Tel.: +31 (0)50 317 1440
Fax: +31 (0)50 317 1449
info@brains-online.com

[Redacted]
BIC [Redacted]
IBAN [Redacted]

VAT N
Trade
www.brains-online.com

CONFIDENTIALITY NOTICE: This e-mail message from Brains On-Line (including all attachments) is for the sole use of the intended recipient(s) and may contain confidential and privileged information. Any unauthorized review, use, disclosure, copying or distribution is strictly prohibited. If you are not the intended recipient, please contact the sender by reply e-mail and destroy all copies of the original message. E-mail is susceptible to data corruption, interception, unauthorized amendment, tampering and viruses, and we only send and receive e-mails on the basis that we are not liable for any such corruption, interception, amendment, tampering or viruses or any consequences thereof.

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: 21 July 2015 15:39
To: [Redacted]
Subject: Aanvullende informatie aanvraag AVD247002015156

Geachte [Redacted]

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding." met aanvraagnummer AVD247002015156. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

De brief is ook per post naar de vergunninghouder, [Redacted] verzonden.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains On-line B.V.

De Mudden 16
9747AW Groningen



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centrale
commissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD247002015156

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 21 juli 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding." met aanvraagnummer AVD247002015156. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten en muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk dinsdag 28 juli 2015, indien mogelijk.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

Meer informatie

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

Datum
21 juli 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD247002015156

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

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

3 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Groningen, 23 juli 2015

Betreft: Reactie aanvulling aanvraag AVD247002015156

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Hierbij reageer ik op uw schrijven van 21 juli 2015 waarin u ons vraagt om nadere toelichting op onze aanvraag voor een projectvergunning dierproeven. Het gaat om het project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding." met aanvraagnummer AVD247002015156.

Vraagstelling:

"U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten en muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren "in voorraad gedood" terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?"

Antwoord:

Het is voor de beschreven experimenten mogelijk om dieren van beide geslachten te gebruiken. In de praktijk zijn wij echter net als voor de soort-keuze en die van het type model afhankelijk van de vraagstelling van onze sponsor. In het verleden hebben wij in minder dan 5% van de studies gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren op verzoek van de klant. Het streven zoals door u beschreven kunnen wij onderschrijven. Om deze reden, stellen wij voor ook richting onze sponsors deze vraag actief te gaan stellen bij aanvragen voor onderzoek. Waar het gaat om interne ontwikkelings projecten, zoals bijvoorbeeld deelproject A, zullen wij waar mogelijk vrouwelijke dieren inzetten.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, mochten er nog aanvullende vragen zijn, dan zijn wij uiteraard bereid verdere toelichting te geven.

Met vriendelijke groeten,
Namens de vergunning houder,

[Redacted signature]



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains On-Line B.V.

De Mudden 16
9747AW Groningen



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD247002015156

Bijlagen
1

Datum 11 augustus 2015
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding' met aanvraagnummer AVD247002015156. 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. U kunt met uw project 'Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding' starten. De vergunning wordt afgegeven van 11 augustus 2015 tot en met 15 juni 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. 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 en de door de dierexperimentencommissie gesteld voorwaarde. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

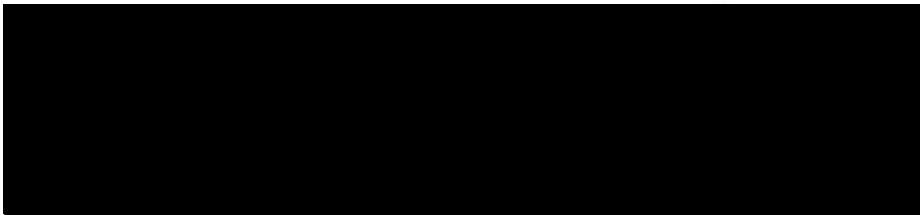
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning
 - Hiervan deeluitmakend: - DEC-advies
 - Weergave wet en regelgeving

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 13 augustus 2015 10:12
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beslissing aanvraag AVD247002015156
Bijlagen: Beschikking AVD247002015156 ondertekend.pdf; Vergunning AVD247002015156.pdf; AVD247002015156_DEC_advies_Brains_On_line_8012_260615.pdf

Geachte heer [REDACTED]

De commissie heeft uw aanvraag met nummer AVD247002015156 beoordeeld. Zie bijlagen.

De ondertekende beschikking is ook nog per post naar u toegezonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 13 augustus 2015 10:19
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling beslissing aanvraag AVD247002015156

Beste meneer [REDACTED]

Op 26 juni 2015 heeft de DEC RUG advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.", uw kenmerk: 8012. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft nog een vraag aan de aanvrager gesteld:

"U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten en muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?"

De aanvrager heeft antwoord gegeven.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen, onder de door u vastgestelde voorwaarde en onder andere door de CCD gestelde voorwaarden:

- 1) De pathologiemodellen mogen niet meer dan matig ongerief geven.
- 2) De Commissie vraagt de IvD met nadruk het gebruik van beide geslachten in overweging te nemen.
- 3) In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.