

Inventaris Wob-verzoek W17-17		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20172804	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x	x	x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x	x	x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x	x	x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x	x	x	x	
8	DEC-advies				x		x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
12	Projectvoorstel nieuw				x	x	x	x	
13	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
14	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x	x	x	x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x	x	x	x	
16	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x	x	x	x	
17	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw				x	x	x	x	
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking en vergunning				x		x		



04 AUG. 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11400 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres

- 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 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 1 januari 2018
- Einddatum | 1 januari 2023
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- pathogenese en potentiële interventie therapieën.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- pathogenese en potentiële interventie therapieën
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | DEC
- Postadres
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Wijziging € Lege

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur\*

*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.*

\* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de [redacted] dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer: [redacted]

Factuuradres: [redacted]

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de Instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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 [redacted]

Functie 13 f functionaris (Proefdierdeskundige)

Plaats Amsterdam

Datum 31-07-2007

Handtekening [redacted]



## Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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.

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

Deze projectaanvraag beschrijft het onderzoek naar "[redacted]" genoemd) **van kinderen**. Leukodystrofieën veroorzaken een gestoorde myeline depositie, myelineverlies of een algemene afbraak van de witte stof. Deze aanvraag betreft een specifieke leukodystrofie, [redacted] is één van de vaakst voorkomende leukodystrofieën bij kinderen en één van de ergste. Bij [redacted] wordt al op zeer jonge leeftijd de witte stof in de hersenen aangetast met neurologische achteruitgang tot gevolg. Patiënten overlijden vaak snel door verlies van functies. Het is een stress-gevoelige ziekte, waarbij fysieke stressoren, vooral koortsende ziekten, leiden tot snelle achteruitgang. In 2001 is vastgesteld dat [redacted] door mutaties van de genen [redacted] wordt veroorzaakt<sup>1</sup>. Deze genen coderen voor de 5 [redacted]. Dit zijn de enige betrokken genen.



[redacted] spelen een essentiële rol in de homeostase van de hersenen. [redacted] De interactie tussen [redacted] en [redacted] is belangrijk voor de functie van het [redacted] in de hersenen en voor de integriteit van de [redacted] reageren op [redacted] door middel van een complex proces, zogenaamde [redacted], wat een algemene, [redacted] met gunstige en ongunstige aspecten. [redacted] reacties variëren van veranderingen in [redacted]



[redacted] **pathologie** varieert in ernst onder patiënten: van babyleeftijd met overlijden binnen een paar maanden tot kinderleeftijd met overlijden binnen enkele jaren tot in zeldzame gevallen volwassenleeftijd met langer overleven. [redacted] pathologie varieert ook in ernst per regio van de hersenen. Niet alleen is er regionale heterogeniteit [redacted], maar ook in kans op herstel. [redacted] is veel ernstiger aangedaan dan [redacted]. In beide gebieden is de schade irreversibel en treedt nooit herstel op. Alleen [redacted] kan stress (vooral koorts) een [redacted] induceren en [redacted] kan remyelinisatie (herstel) plaatsvinden. We hebben vastgesteld dat [redacted]. De grijze stof, waaronder de cortex, is niet aangetast en astrocyten zien er normaal uit. De variatie in ernst van de ziekte en de regionale variatie in ernst van de pathologie maakt het mogelijk [redacted] te correleren met de ernst van de lokale ziekte.

*Als we begrijpen waarom [redacted] het zoveel beter doen, kunnen we dit misschien in therapie vertalen.*

We hebben aanwijzingen op een stoornis in de [redacted]. *Dat de [redacted] bijdraagt aan de [redacted] pathologie in [redacted] is zeker; hoe moet nog worden onderzocht.*

Voor verder onderzoek hebben wij **2 muismodellen** ontwikkeld met dezelfde mutaties als in de mens voorkomen. Deze muizen vertonen dezelfde klinische kenmerken en wittestofafwijkingen als patiënten en kunnen daarom gebruikt worden voor verder onderzoek<sup>3</sup>. Met deze muizen zijn recent



sterke aanwijzingen gevonden dat bij [REDACTED] inderdaad primair de astrocyten en secundair de oligodendrocyten zijn aangetast<sup>3</sup>.

Onderzoek naar het **moleculaire mechanisme** van [REDACTED] heeft aangetoond dat door de mutaties de activiteit van [REDACTED] verlaagd is. [REDACTED] is essentieel voor de vertaling van mRNA naar eiwit en voor de regulatie van de snelheid van mRNA vertaling en daarmee de eiwitsynthesesnelheid. Met name is [REDACTED] belangrijk voor het [REDACTED] van de eiwitsynthese bij stress, zoals koorts. Deze reactie heet de [REDACTED]). De verlaagde activiteit van [REDACTED] leidt tot een chronische abnormale activatie van de [REDACTED] met verhoogd expressie van verschillende [REDACTED]. Als gevolg hiervan treedt een verandering van het [REDACTED] profiel op.

Wij hebben onderzocht wat het afwijkende [REDACTED] profiel is in de hersenen van [REDACTED] patiënten en muizen (ongepubliceerde data). [REDACTED] van [REDACTED] muizenhersenen heeft [REDACTED] geïdentificeerd, die verhoogd of verlaagd tot expressie komen in [REDACTED] vergeleken met wildtype controle muizen. De screen is bevestigd op [REDACTED] en [REDACTED] met behulp van [REDACTED] en [REDACTED]. We vinden dat alleen astrocyten en oligodendrocyten een afwijkende [REDACTED] vertonen. Immunohistochemische analyses op postmortem hersenmateriaal hebben aangetoond dat astrocyten en oligodendrocyten bij patiënten dezelfde afwijkende eiwitexpressie vertonen als de [REDACTED] muizen. We hebben gevonden dat de eerder gevonden afwijkende expressie van [REDACTED] gereguleerd wordt door [REDACTED] - [REDACTED] als [REDACTED] en mogelijk ook [REDACTED] en [REDACTED].

Hoe de regulatie precies verloopt, is nog onvoldoende bekend. Wij hebben in hersenen van [REDACTED] patiënten en [REDACTED] muizen bevestigd dat de [REDACTED] gereguleerde pathways, zoals [REDACTED] geactiveerd zijn in astrocyten en oligodendrocyten. Een link tussen [REDACTED] mutaties en gestoorde [REDACTED] van astrocyten en oligodendrocyten in [REDACTED] is nog onvoldoende onderzocht. *Onduidelijk is of de [REDACTED] een (onvoldoende) beschermende of causale rol in het VWM ziektemechanisme heeft.* Door de [REDACTED] activiteit of de daardoor gereguleerde pathways (ook aangeduid als routes) te moduleren kunnen we deze vraag beantwoorden. Deze modulaties kunnen farmacologisch of genetisch bewerkstelligd worden in de [REDACTED] muismodellen. Om exact te begrijpen hoe de [REDACTED] activiteit het best kan worden gemoduleerd om de ziekte [REDACTED] te beïnvloeden, wordt het onderzoek op verschillende niveaus uitgevoerd en worden resultaten onderling vergeleken. De resultaten zullen leiden tot inzicht in hoe remming of verbetering van de ziekte bij [REDACTED] patiënten kan worden bereikt.

Er is geen **behandeling** voor [REDACTED] en het ziektemechanisme is onvoldoende duidelijk om verder te komen. Wel is duidelijk dat astrocyten bij [REDACTED] een grote rol spelen en dat [REDACTED] functies aangedaan zijn. Daarom focussen we de laatste jaren op ontrafelen van de bijdrage van [REDACTED] aan ontstaan en progressie van de ziekte *in alle opzichten*. Voor herstel van de witte stof is het noodzakelijk dat [REDACTED] hersteld worden. Het aanpakken van verschillende [REDACTED] dysfuncties vereisen verschillende therapieën en *een succesvolle therapie zal derhalve multimodaal zijn*, net als bij andere leukodystrofieën<sup>6</sup>. Vanwege de ernst van de ziekte en het overwegend voorkomen op de jonge kinderleeftijd en ontbreken van overlevingskansen is het cruciaal om onderzoek naar multimodale therapie nu uit te voeren. Onderzoek aan het ziektemechanisme en potentiële behandelstrategieën voor [REDACTED] vormen het doel van het beschreven werk, in vervolg op bovenbeschreven eerder gevonden resultaten. Dit onderzoek is uitgesplitst in verschillende deelonderzoeken, die elk met elkaar samenhangen en waar resultaten voortdurend worden vergeleken met resultaten uit patiëntmateriaal. Op basis van die gegevens wordt het plan bijgesteld. Dit wordt duidelijk gemaakt in de flowchart, besproken bij 3.4.3.

Het gehele onderzoek wordt vanuit de volgende 4 disciplines uitgevoerd in muismodellen: (1) in vivo, (2) ex vivo moleculair biologisch, (3) biochemisch, en (4) histopathologisch zonder en met interventies. Op deze manier kunnen snel gegevens binnen een multidisciplinair team worden verkregen en vergeleken met het huidige of nieuw patiëntmateriaal. De interventies bestaan uit het toedienen van [REDACTED] en [REDACTED]. Deze interventies worden hierna verder

uitgelegd. Voor deze multidisciplinaire aanpak is een grote subsidie aangevraagd, waarin al deze aspecten zijn benoemd. Einddoel is het ontwikkelen van multimodale therapie voor ██████ gebaseerd op de verworven kennis.



### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

#### **Het hoofddoel is te komen tot een multimodale therapie voor patiënten met ██████**

Daarvoor gaan we ons de komende jaren richten op onderzoek van de pathologie, inclusief de impact van specifieke interventies, en de achterliggende mechanismen van de astrocytaire dysfunctie. Hiervoor zullen we materiaal gebruiken zowel geïsoleerd uit hersenen van overleden patiënten als uit muismodellen (normaal en ██████ waarin de ziekte is gemoduleerd. Het doel is alle mogelijke aangrijpingspunten voor therapie van ██████ te exploreren en op grond van de resultaten te komen tot ██████ therapie voor patiënten.

Deze projectaanvraag is onderverdeeld in vier sub-vragen, die onderling verband houden met elkaar en bij 3.4 verder worden uitgelegd en onderbouwd.

#### **Bijlage 1: Behandeling van ██████ in muizen met ██████ gericht op o.a verbeterde ██████ functie.**

M.a.w. vormen ██████ het enige celtype of zijn er nog andere celtypen waarop gentherapie gericht moet worden om verbetering te bereiken?

#### **Bijlage 2: Behandeling van ██████ in muizen door modulatie van ██████ moleculaire routes**

M.a.w. zijn verminderde ██████ activiteit en ██████ activatie als enige routes verantwoordelijk voor het disfunctioneren van astrocyten en/of de pathologie van de witte stof in ██████

#### **Bijlage 3: Verbetering van ██████ functie ex-vivo na isolatie van ██████ uit muizen met ██████**

M.a.w. welke (slechte) functies van ██████ moeten geremd worden en welke (goede) functies moeten worden versterkt ten gunste van ██████

#### **Bijlage 4: behandeling van ██████ in muizen met ██████ en/of ██████ (van ██████ modulatie van ██████ en ██████ pathways, en / of ██████ correctie)**

M.a.w. kan ██████ de beschadigde witte stof bij ██████ herstellen en is het resultaat beter met combinatie therapie die geoptimaliseerd is in bijlage 1 - 3?

Daar alle onderzoeksvragen uit bijlagen 1 – 4 grotendeels parallel zullen worden uitgevoerd, waarbij tussentijds strategische besprekingen zullen zijn om go no-go's per bijlage te bespreken (keuze vervolgstap/diermodel/interventie) is een traject van 5 jaar haalbaar om naar een eerste aanzet voor een multimodale aanpak van ██████ te komen. Er is funding om het onderzoek te kunnen uitvoeren. De onderzoekers hebben jarenlange ervaring op dit gebied. Er is veel samenwerking tussen de



onderzoekers en de kliniek. De technische expertise om de experimenten (zowel in vivo als ex-vivo) is al aanwezig.

Gezien het voorwerk, de preliminaire data, het aantal mensen in de onderzoeksgroep en de expertise van de onderzoeksgroep met toonaangevende publicaties is het project zeer haalbaar. Het onderzoek hangt niet van het succes van 1 specifiek experiment af.

### 3.3 Belang

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

██████████ is één van de vaakst voorkomende en één van de ernstigste genetische ziekten van de ██████████ ("") bij kinderen. Leukodystrofieën komen bij tenminste 1:7,500 kinderen voor, waarschijnlijk vaker. ██████████ is klinisch gekarakteriseerd door progressieve motorische problemen en verlies van ook andere neurologische functies door progressief verdwijnen van de witte stof in de hersenen. De beginleeftijd en ernst van ██████████ varieert en is afhankelijk van het de precieze mutatie (genotype). De ernstigste vorm van ██████████ ontstaat al intra-uterien; de pasgeborenen hebben een ernstige encefalopathie en afwijkingen van ogen en interne organen; zij sterven binnen enkele maanden. Bij de meeste kinderen met ██████████ ontstaat de ziekte tussen 1 en 6 jaar en volgt overlijden na enkele jaren. Latere vormen van ██████████ met ontstaan na de 6 jaar zijn veel zeldzamer; dan verloopt de ziekte langzamer en leidt de ziekte tot een langzaam progressieve encefalopathie en sterven na enkele tot enkele tientallen jaren. Voor ██████████ is geen behandeling beschikbaar. Het is daarom belangrijk de pathogenese van deze ziekte beter te begrijpen om daarmee aangrijpingspunten voor interventie strategieën te vinden. Hopelijk geven de gegevens die verkregen worden uit het hier beschreven onderzoek aanwijzingen voor behandeling van deze ziekte, zodat ernstige invaliditeit en (vaak zeer) vroege mortaliteit voorkomen kan worden.

#### Wetenschappelijk belang

Wetenschappelijk is het belangrijk dat het ziektemechanisme wordt opgehelderd (de rol van ██████████ mechanismen en signaaltransductie bij ██████████ en gepubliceerd, zodat deze informatie voor alle relevante wetenschappers beschikbaar is. De aanpak die wij voor ogen hebben kan mogelijk ook informatie opleveren voor onderzoekers die aan andere ██████████ werken dan ██████████. Bijvoorbeeld is ██████████.

#### Maatschappelijk belang

Maatschappelijk is het belangrijk dat op basis van de wetenschappelijke gegevens onderzoek kan worden uitgevoerd naar de preventie en behandeling van deze ernstige ziekte, die veel leed en ook zeer hoge kosten met zich meebrengt. Daar het lijden van de patiënt ernstig en uitzichtloos is en het vaak (zeer) jonge kinderen betreft, is het leed voor de familie zeer groot. Momenteel is er geen therapie, alleen ondersteunende behandeling om het lijden te verlichten. Om een snelle voortgang van het onderzoek te garanderen is het belangrijk dat de voorbereidende stappen beschreven in de verschillende addenda apart van elkaar maar parallel kunnen worden uitgevoerd.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het primaire doel is een begin te maken van het ontwikkelen van ██████████ therapie voor ██████████. Hiervoor is een verdere opheldering van het ziektemechanisme onderliggend aan ██████████ en inzicht in het ██████████ falen noodzakelijk. Het onderzoek zal deels met patiëntmateriaal worden uitgevoerd en deels met materiaal uit genetisch gemodificeerde muizen, die dezelfde klinische verschijnselen en moleculaire en histopathologische afwijkingen vertonen als ██████████ patiënten, met wild-type dieren als controle.

Het onderzoek is verdeeld in de volgende research onderdelen:

### 1. █ therapie

Gebaseerd op literatuur gegevens dat █ bij andere █ verbetering laten zien in de patiënt en de nieuwe █ constructen veilig worden geacht voor de patiënt; op welk celtype deze therapie bij █ gericht moet worden staat nog niet vast (alleen █ █ en █ of alle █ cellen?).

### 2. Farmacologische therapie

- zoals met █ compounds, die █ activiteit of █ pathways beïnvloeden;
- om het █ minder toxisch te maken.

3. █ therapie om zieke █ en █ te vervangen en weefschade te herstellen.

### 4. De combinatie van 1.-3. Is de basis van de █ therapie:

Er zijn toenemende aanwijzingen dat █ aanpak bij █ beter effect heeft<sup>6</sup>. Sinds 2009 werken wij aan de ontwikkeling van stamceltherapie en farmacologische therapie. Daarbij kunnen nieuwe inzichten in het ziektemechanisme leiden tot nieuwe therapie strategieën.

█ was tot nog toe een onbehandelbare ziekte, waar de uitkomst van vaststond: toenemende handicap en overlijden. Met meer inzicht komt therapie voor █ dichterbij. Uit onderzoek aan andere █ blijkt █

---

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

De gegevens die wij tot nu toe hebben verkregen uit zowel patiënt als muis zijn de basis voor het huidige onderzoek.

De muismodellen die wij hebben ontwikkeld geven een representatief beeld van de menselijke ziekte █. De twee █ modellen (█ █) hebben mutaties waarvan bekend is dat beide mutaties bij █ patiënten onafhankelijk van elkaar een ernstig ziektebeeld veroorzaken. In de twee muismodellen zijn vergelijkbare klinische en histopathologische verschijnselen waargenomen als wij bij patiënten hebben gezien:

- █ (█ █) muizen;
- en de █ (█) muis.

Hiervan is de █ het mildste model, en de █ het ernstigste model.

**Bijlage 1 █ therapie:** beschrijft de onderzoeksvraag of █ een puur █ ziekte is en de ziekte alleen gedreven wordt door de zieke █. Het moet duidelijk worden of er een 'by-pass' mechanisme is waardoor █ niet door gezonde █ gerepareerd kan worden. Dit is met name een celbiologische aanpak.

**Bijlage 2 [redacted] therapie (in vivo):** beschrijft de moleculaire routes van [redacted] en richt zich op de rol van [redacted] aangestuurde routes zoals de [redacted]. Welke afwijkende [redacted] speelt daarbij een rol en kan het moduleren van [redacted] routes het ziekteproces beïnvloeden? De nieuwe muismodellen (o.a. door kruisingen van de [redacted] met specifieke [redacted] muizen stammen) worden gedegen in kaart gebracht. Daarnaast zullen farmaca toegepast worden, die specifiek aangrijpen op een onderdeel van [redacted] waarna het effect in het model bestudeerd kan worden. Hier vinden interventies ('behandelingen') plaats, en worden naast de ex-vivo analyse van moleculair-biologische en histologische parameters ook klinische relevante parameters beoordeeld op het gebied van motoriek als [redacted].

**Bijlage 3 farmacologische therapie (ex vivo):** beschrijft met ex-vivo materiaal (mens en muis) m.b.v. cel- en weefselkweek en eiwit analyses hoe de [redacted] stress geïnduceerde demyelinisatie en het noodzakelijke herstel daarvan bepalen. We willen duidelijk krijgen waarom en hoe het herstelmechanisme van de [redacted] faalt.

**Bijlage 4 [redacted] therapie:** beschrijft het effect met [redacted] therapie op [redacted] muizen, geïsoleerd gevolgd door verschillende combinaties met voorafgaande [redacted] therapie of [redacted] modulatie van het [redacted] routes met stoffen, die uit eerder onderzoek of uit resultaten van bijlage 1 – 3 geselecteerd zijn. Hier wordt dus de optimale [redacted] therapie gezocht.

---

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.

---

Het onderzoek naar de pathogenese en het onderzoek naar de mogelijke behandeling van patiënten met [redacted] hangen nauw met elkaar samen. De behandeling streeft er immers naar om op cel niveau het falen van de [redacted] in verschillende [redacted] te kunnen herstellen. Er is daarom bewust gekozen om enerzijds door [redacted] en [redacted] onderzoek de betrokken [redacted] te onderzoeken en door [redacted] onderzoek het [redacted] mechanisme te doorgronden en anderzijds daar waar meer inzicht verkregen wordt in een [redacted] of [redacted] mechanisme dat te repareren door [redacted].

Deze benadering is bewust verdeeld in de expertises van betrokken onderzoekers ([redacted] / [redacted]). Het gehele onderzoek valt onder de supervisie van de hoogleraar die als [redacted] ook het patiënten onderzoek leidt. In deze multidisciplinaire groep van onderzoekers worden de resultaten gezamenlijk besproken en worden vervolgstappen in het onderzoek vastgesteld. Per bijlage worden deze specifieke mijlpalen en keuzemomenten besproken, zodat per bijlage 1 – 3 alleen de optimale interventie uiteindelijk in combinatie met [redacted] in bijlage 4 zal worden onderzocht. .

Het onderzoek wordt breed opgezet door [redacted] (in muizen modellen) onderzoek te verrichten en de gegevens continue met elkaar te vergelijken. Indien in een van de onderzoekslijnen (lees dierproef beschreven in de bijlagen) resultaat gevonden wordt, wordt dit direct besproken met alle onderzoekers en wordt indien nodig het onderzoek aangepast. Daar waar gegevens leiden tot een 'dood spoor', wordt het gerelateerde onderzoek in de andere onderzoekslijn stopgezet.

Eén en ander moet duidelijk worden uit de flowchart bij 3.4.3. met de 'go-no go momenten' erin opgenomen welke per bijlage staan vermeld.

---



**Figuur 1: Flowchart voor combinatietherapie via afzonderlijke benaderingen.**

De flowchart brengt de strategie in beeld om met gegevens vanuit de patiëntjes, welke input geven om de ziekte eerst via aparte benaderingen ( ) specifiek te onderzoeken. De onderzoeksstrategieën in bijlages 1,2,3 en 4 zullen simultaan starten. Binnen iedere bijlage zijn er GO en NO-GO stappen. Daarnaast zullen onderzoeksresultaten binnen iedere bijlage geprojecteerd worden op de andere bijlages (blauwe pijlen). Alle verkregen resultaten zullen in bijlage 4. Alleen die benaderingen welke verbetering geven, zullen doorgaan voor het onderzoek met therapie. Hiermee willen vinden welke aangrijpingspunten helpen om de ziekte te verbeteren. Met een combinatie therapie moeten de afzonderlijke benaderingen elkaar versterken en hopen we uiteindelijk de ziekte tot stilstand te kunnen brengen of te genezen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Behandeling van in muizen met therapie gericht op o.a verbeterde functie.
2	Behandeling van in muizen door modulatie van moleculaire interventie
3	Verbetering van functie door interventie: ex-vivo analyses na isolatie van o.a uit muizen met
4	Behandeling van in muizen met van en / of
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Neurodegeneratieve ziekten zijn aandoeningen waarbij hersenen en of zenuwstelsel zijn aangedaan. Een van de ernstigste ziekten op dit gebied bij kinderen is de erfelijke wittestofziekte waarbij de witte stof uit de hersenen verdwijnt. Deze ziekte wordt om die reden "██████████") genoemd, "verdwijnende witte stof" en valt onder de zogenaamde ██████████ (de genetische hersen-wittestofziekten). Hierdoor ontwikkelen deze kinderen o.a motorische coördinatieproblemen, spasticiteit en epilepsie. Veel van deze kinderen sterven al heel jong, maar ook de milde vorm van deze ziekte veroorzaakt een relatief vroege dood. Als in gezonde kinderen en volwassenen de witte stof van de hersenen beschadigd wordt, ██████████ Wij hebben eerder gevonden dat dit herstelmechanisme bij kinderen met VWM faalt. Uit de kliniek weten we dat koorts de ziekte snel kan verergeren. Met

dit onderzoek willen we met verschillende onderzoeksmethoden uitzoeken hoe [redacted] werkt, waarom [redacted] de ziekte zo snel verergert en hoe de [redacted] hersteld kan worden. De resultaten samen moeten leiden tot een behandelwijze waarbij de ziekte tot staan kan worden gebracht of misschien zelfs wel genezen kan worden.

Om goed te onderzoeken welke cellen, enzymen en eiwitten betrokken zijn, wordt eerst onderzoek uitgevoerd op hersenen van overleden patiëntjes. Dat gebeurt door hersencellen ([redacted] op een speciale manier in het laboratorium te kweken en onder de microscoop te bekijken. Ook kunnen met speciale technieken betrokken enzymen, eiwitten of anders stoffjes geïsoleerd worden. De gegevens worden vergeleken met gegevens die uit gezonde hersenen verkregen worden. Aan de hand van deze vergelijking wordt duidelijk welke cel of eiwit behandeld moet worden om de [redacted] te beïnvloeden. Dat is het hoofddoel van deze aanvraag en wordt in het proefdiermodel uitgezocht, dat de ziekte van het patiënt goed nabootst omdat het dezelfde genetische afwijking heeft. De bedoeling is de invloed van een [redacted] op de ziekte op hersenniveau te onderzoeken. Ook kunnen we in dieren de effecten van behandeling op het loopgedrag bestuderen. [redacted] is een zeer complexe ziekte. Wij denken dat behandeling op [redacted]. Dat wordt [redacted] genoemd.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Uiteindelijk moet het onderzoek leiden tot een [redacted] voor patiënten met [redacted]. Met [redacted] therapie wordt een [redacted] behandeling met verschillende onderdelen bedoeld. Wereldwijd lijden 1 op de 7500 kinderen aan een vorm van [redacted]. Het onderzoek zal veel wetenschappelijke informatie opleveren om te begrijpen hoe [redacted] precies ontstaan en hoe deze behandeld kunnen worden. Indien dit lukt, kunnen kinderen behandeld worden en zal de ziekte tot stilstand worden gebracht of kan zelfs herstel bereikt worden. Hiermee wordt vroegtijdige kindersterfte voorkomen en heel veel leed in de familie.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

[redacted]

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De dieren die model staan voor de ziekte zullen net als de kinderen motorische coördinatieproblemen gaan vertonen, en als er niet tijdig wordt ingegrepen ook verlamd raken. De dieren zullen echter voor dat dit gebeurt gedood worden.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

De dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. Daar waar een [redacted], zal het ongerief licht zijn. Een deel van het onderzoek kan worden gedaan met [redacted] uit de muizen. Van alle dieren zal ongeveer 40% licht ongerief en 60% matig ongerief ondervinden.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren zullen worden gedood om de hersenen te kunnen onderzoeken en waarbij wordt gekeken of er [redacted].

## 4 Drie V's



- 4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- Er worden wel proefdier vrije methoden gebruikt in het vooronderzoek. Om echter de afwijkingen en de behandeling van deze afwijkingen goed te kunnen onderzoeken is een intact lichaam nodig. De dieren worden gebruikt om geneesmiddel, dieet, gedrag te kunnen meten. Dit kan niet door b.v. celkweek worden vervangen!  
Het onderzoek mag uiteraard niet in kinderen gebeuren als nog te weinig bekend is of de behandeling zal werken en of die behandeling dan ook veilig is. Daarom worden muizen gebruikt om de patiënten na te bootsen. De muis staat dus model voor de patiënt.
- 4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Er wordt zoveel mogelijk gebruikt gemaakt van materiaal van overleden patiënten. Voor het onderzoek in de muis, wordt per experiment een onderzoeksplan opgesteld met daarin het minimale aantal dieren waarmee het onderzoek kan worden uitgevoerd. Soms is het nodig eerst een klein voorexperiment uit te voeren (een 'pilot') om de haalbaarheid of het beste model te toetsen. Er is een beslisboom gemaakt, met verschillende uitkomsten per experiment. Aan de hand van die uitkomst wordt het vervollexperiment ontworpen. Het aantal dieren in deze projectaanvraag beschrijft het maximale aantal dieren, waarschijnlijk zullen veel minder dieren gebruikt gaan worden.
- 4.3 **Verfijning**  
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- De muis is het kleinste model waarin de ziekte kan worden nagebootst met dezelfde mutatie in het gen als in de patiënt. Dit model is door ons goed in kaart gebracht. De ziektekenmerken in de muizen komen precies overeen met die van de patiëntjes, en zijn door diervverzorgers goed waarneembaar. De ingrepen worden uitgevoerd door bekwame en ervaren medewerkers. De huisvesting en de voeding van de muizen is gestandaardiseerd zodat weinig spreiding in de resultaten van het onderzoek wordt verwacht.
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- Het is bekend op welke leeftijd de dieren motorische problemen kunnen gaan vertonen. Ruim voor die tijd wordt het voer op de bodem van de kooi gelegd en worden lange tuiten op de drinkflessen gezet, zodat de dieren makkelijker kunnen eten en drinken. De dieren worden elke dag zorgvuldig geobserveerd en er zijn criteria vastgelegd aan de hand waarvan kan worden vastgesteld dat de spierverswakking gaat optreden. Indien verwacht wordt dat de dieren daarbij meer dan matig ongerief zullen gaan hebben, zullen ze worden gedood zodat het maximale ongerief niet meer dan matig zal zijn.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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	Behandeling van ██████████ met ██████ therapie gericht op o.a verbeterde ██████████ functie.

*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.

De huidige gegevens wijzen erop dat ██████ een ████████████████████ is. Een alternatieve hypothese is dat ██████ wordt veroorzaakt door een simultaan effect door een mutatie van ██████ op verschillende ██████████ celtypes. Deze vraag of ████████████████████ ziekte is kan worden beantwoord door onderzoek (ex-vivo) op de ██████████ van verschillende mutante muizen stammen.

**1. Door kruising van conditionele ██████████ knock-in muizen aan celspecifieke cre lijnen, wordt onderzocht of selectieve expressie van mutant ██████████ voldoende is om ██████████ ziekte te veroorzaken**

Een nieuwe Cre-loxP conditionele ██████████ knock-in muizenstam, waarbij de mutatie door kruising selectief in verschillende celtypes tot expressie gebracht kan worden, wordt momenteel met CRISPR-Cas9 techniek elders gemaakt. De specifieke rol van ██████████ zal onderzocht worden door de conditionele *Eif2b5* knock-in te kruisen met muizenstammen die Cre recombinase in ██████████ ██████████ tot expressie brengen.

**2. Met behulp van *in vivo* lentivirale transductie, wordt onderzocht of genetische correctie in een specifieke ██████████ celpopulatie de ziekte voorkomen kan worden.**

Gebruikmakend van de beschikbare ██████████ modellen (als eerste keus het ██████████ mutante model [verder te noemen ██████████] met mild ongerief) zullen wij het genetische defect selectief corrigeren door ████████████████████ Deze benadering is gebaseerd op het feit dat in recessieve ziekten zoals ██████████ de introductie van één normale kopie van het gemuteerde gen al voldoende is de ziekte te genezen omdat heterozygote carriers geen ziektebeeld hebben. Om de resultaten van deze gen-correctie te bestuderen zullen we lentivirussen gebruiken die het wild type (WT) ██████████ gen tot expressie brengen van een promotor waarvan bekend is dat tot expressie komt in ██████████ celtypes. We verwachten dat correctie

in [redacted] het beste herstel geeft. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat ook andere kruisingen ([redacted] mutatie in specifieke celpopulatie) een phenotype geven, wordt er gekozen voor gencorrectie in [redacted] cellen.

De constructen zullen een [redacted] hebben met een polycistronic vector ontwerp gebaseerd op de [redacted] (b.v. [redacted]). Dit zal het monitoren van de transductie efficiëntie en de *in-vivo* aanwezigheid en expressie faciliteren. [redacted] vectoren met alleen het [redacted] zullen als controle worden gebruikt. Deze [redacted] correctie zal direct na de geboorte en lang voor de start van de pathologie worden uitgevoerd in [redacted] muizen.

In alle muizen zal het volgende worden onderzocht:

- a. klinisch fenotype ([redacted]);
- b. ex-vivo h[redacted] pathologie (histologie coupes), inclusief electronen microscopie;
- c. ex-vivo [redacted] maturatie, bepaling [redacted]; dit onderzoek zal op verschillende leeftijden worden uitgevoerd met immunohistochemie en RT-PCR voor [redacted] markers.

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.

- A.** [redacted] injectie met [redacted] op dag 0: pups worden na spontane partus van het moederdier gebruikt.

Er is gekozen voor [redacted] injectie op P0-1 omdat de behandeling vroeg in de ontwikkeling gedaan moet worden en op deze leeftijd de toediening snel uitgevoerd kan worden. De P0-1 pups worden verdoofd dmv hypothermia (10-20C). De dieren worden niet direct op het ijs gelegd om bevroren huid te voorkomen. De cellen worden [redacted] ingebracht. Het injectievolume bedraagt maximaal 1 µl. Na toediening worden de pups op een warmhoudmatje geplaatst en na ontwaken terug bij de moeder gelegd.

**Tabel 1: overzicht handelingen**

A. Soort ongerief	B. Frequentie	C. Duur v.h. ongerief
[redacted] injectie	eenmalig	10 min.
[redacted]	Max 3 maal	Max 5 min per test
[redacted]	Max 3 maal	Max 5 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 5 min per test
Euthanasie	1 maal	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4 maanden		2-6 maanden

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

Het volgende go-no-go schema wordt aangehouden:

Vraag	Stap		Aantal dieren	go / no go
1	a	In vivo analyse van [redacted] mutatie in specifieke [redacted]	max. 30	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende [redacted] maturatie in brein: go naar Stap b
	b	In vivo analyse van [redacted] mutatie in specifieke [redacted] leeftijd	max. 130	

2	a	In vivo analyse van LV gencorrectie in specifieke [REDACTED] [REDACTED]	max. 144	Wanneer aanwezig van klinisch fenotype en / of afwijkende [REDACTED]: go naar Stap b
	b	In vivo analyse LV gencorrectie in specifieke [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	max. 288	

### Vraag 1:

#### Stap a:

- [REDACTED] muizen worden gekruist aan 4 cre-lijnen (cre-expressie in alle cellen, [REDACTED] [REDACTED] cellen), of als controle niet gekruist. Alle dieren worden in eerste instantie op 1 leeftijd geanalyseerd: [REDACTED]  
[REDACTED]
- Analyses worden uitgevoerd op vers (snap-frozen) en gefixeerd (4% PFA intracraniale perfusies) weefsel
- Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
■ [REDACTED]  
Aantal dieren: 5 lijnen (4 kruisingen + 1 controle) x 1 leeftijd (5 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 30 dieren
- Alleen de dieren die een fenotype vertonen worden gebruikt in verdere analyses ('go'); andere dieren worden uit de studie gehaald ('no-go').

#### Stap b:

- Wanneer de dieren in Stap 1 een fenotype vertonen, zullen deze kruisingen ook in Stap 2 worden geanalyseerd: meer verschillende leeftijden.
- Conditionele [REDACTED] mutanten worden geanalyseerd op [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] of eerder als er significante verbetering is gezien in de behandelde groep(en).
- De 12 maanden dieren worden op maximaal 7 maanden geanalyseerd met [REDACTED] (om het aantal dieren te verminderen wordt deze groep dus voor 2 parameters gebruikt). Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
■ [REDACTED]  
Aantal dieren voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 2 (1 kruising = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 40 dieren
- Om de [REDACTED] maanden dieren te verzamelen. Gebaseerd op een eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd: [REDACTED]  
[REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]  
■ [REDACTED]  
Aantal dieren voor pre-symptomatische analyse: 2 (1 kruising + 1 controle) x 1 leeftijden ([REDACTED]) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 12 dieren
- Zullen er meer leeftijden van verschillende kruisingen worden geanalyseerd, hoeft er geen nieuwe controle groep worden meegenomen. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]. En voor 4 kruisingen voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 5 (4 kruisingen = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 100 dieren
- Maximaal aantal muizen: 52 – 130

### Vraag 2:

#### Stap a:

Gen correctie met virale constructen die specifieke [REDACTED] celtypen targeten, dmv [REDACTED] [REDACTED] Als controle wordt MOK virus gebruikt. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat meer dan 1 kruising [REDACTED] mutatie in specifieke celpopulatie) een phenotype geeft, wordt er gekozen voor gencorrectie op maximaal 2 celtypes (= 2 genconstructen).

- Poweranalyse: Gebaseerd op eerdere studies ([REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED])
  - 20 dieren per groep. Per nest worden 5 tot 6 dieren geboren; dus 4 nestjes (20 dieren) per groep per leeftijd. Indien er meer dieren worden geboren, worden die wel gebruikt in het experiment, dus wordt verder met 24 dieren gerekend
  - Maximaal aantal dieren: 3 injecties (2 genconstructen, MOK) x 1 leeftijd ([REDACTED]) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 120 - 144 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met MOK) wordt getest, zal dit 80 - 96 dieren zijn.

**Stap b:**

- Wanneer dieren op [REDACTED] (Stap 1) een verbeterd fenotype vertonen, zullen meerdere leeftijden worden bekeken tot maximaal het humane eindpunt.
- Aantal dieren: 3 injecties (genconstruct, MOK) x 2 leeftijden ([REDACTED], max humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 240 - 288 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met MOK) wordt getest, zal dit 160 - 192 dieren zijn.

**B. De dieren**

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

Muis, mus musculus en genetisch gemodificeerde muizen.

Cre-loxP conditionele [REDACTED] knock-in muizenstam

Muislijnen die Cre recombinase in [REDACTED] cellen tot expressie brengen

Alle dieren zijn afkomstig van erkende fokkers EU/USA of eigen fok.

Maximaal **592** dieren

.

Levensstadia: pups (beide sexen) welke spontaan worden geboren en weke op dag 0 of 1 worden behandeld.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED].

-

**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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

**Vervanging:** Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED] Daarnaast kunnen wij niet vrijelijk therapeutica uitproberen bij levende patiënten. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden ([REDACTED]); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

**Vermindering:**

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Van het uitgenomen materiaal ([REDACTED]) wordt alles gebruikt voor verdere ex-vivo analyse. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

**Verfijning**

Zodra blijkt dat na interventie significante fenotypische veranderingen worden waargenomen, zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar wordt.

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.

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED].

## 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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het wegnemen van de pups voor de [REDACTED].

Kenmerken van [REDACTED] ziekte in muizen: [REDACTED].

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

Maximaal dagelijkse observaties van [REDACTED].

Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.

[REDACTED]. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

### 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.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

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

10%

### K. Classificatie van ongerief

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

**Tabel 2: ongerief per handeling**

A. handeling:	B. kwalificatie <i>terminaal/gering/matig/ernstig</i>	C. duur v.h. ongerief
Uithalen baarmoeder	terminaal	
████████████████████	Matig (onder anesthesie)	10 min.
██████████████	Gering	3x 5 min
██████████	Gering	4x 5 min
Doden	Licht (onder anesthesie)	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4mnd	Matig	2-6 maanden

**Cumulatief ongerief: Matig voor de pups  
Terminaal/Licht voor de moederdieren**

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De ██████████ moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyses, een deel van de pups wordt onder anesthesie geperfundeed ██████████ te maken voor immunohistochemie.

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

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

### 1 Algemene gegevens

1. Vul uw deelnemernummer van de ANVVA in.
1. Vul de naam van de instelling of organisatie

1. Vul het volgnummer en het type dierproef in.
 

Volgnummer	Type dierproef
2	Behandeling van <input type="text"/> in muizen door modulatie van <input type="text"/> routes

*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.

Gebaseerd op uitkomsten van eerdere experimenten in onze groep zal verder onderzocht worden wat de moleculaire mechanismen zijn achter de ziekte . Hierbij hopen we de effecten van selectieve mutaties van het  op te helderen, en nieuwe aanwijzingen te vinden voor therapie in patiënten. De experimentele set-up gaat hierbij dieper in op de mechanismen en de invloed van  routes op .

De primaire uitkomst parameters zijn:

- In-vivo:
- Ex-vivo:
- Ex-vivo:

**Hoofdvraag:** hoe leiden mutaties van het  tot het disfunctioneren van  hersen- pathologie en klinische verschijnselen in muizen met  (hierna aangegeven als "ziekte").

**Aanpak:** door  routes die door  gereguleerd worden te veranderen en vervolgens de effecten op klinische ziekte verschijnselen en de hersenpathologie te onderzoeken.

We weten dat één van de door  routes, de , zoals beschreven in de projektbeschrijving, actiever is in  van muizen en mensen met  dan in controles. Op dit moment weten we echter niet of veranderde  en  routes als de  oorzakelijk bijdrage aan "ziekte" of dat ze juist beschermend werken maar tekort schieten met  als gevolg. Het is bekend dat enzym activiteit van  direct en indirect de expressie van een groot aantal genen reguleert. Wij weten nog niet welke

onderdelen van de door [REDACTED] geregleerde routes belangrijk zijn in [REDACTED] en hoe (gunstig of ongunstig). Daarnaast kunnen andere routes ook aan [REDACTED] "ziekte" bijdragen of beschermen tegen "ziekte". **Voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie is het belangrijk om beter begrip te hebben van het mechanisme hoe mutaties van [REDACTED] en hoe veranderingen in door [REDACTED] routes bijdragen aan VWM.**

**Op dit moment wordt experiment 1 in deze bijlage al uitgevoerd gebaseerd op een DEC project [REDACTED]**

**N.B.** Dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 ivm de fok van voldoende dieren voor experiment. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een (tijdrovend) amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

**In experiment 1** worden de [REDACTED] en [REDACTED] eerst gemoduleerd met een farmakon ([REDACTED]).

In vervolggexperimenten willen we de bijdrage van [REDACTED] routes verder uitzoeken door een [REDACTED] interventie (door gebruik te maken van [REDACTED] muizenstammen, beschreven in 2A) en [REDACTED] modulatie (beschreven in 2B). Ook kan de bijdrage verder onderzocht worden met een aangepast [REDACTED] waarin [REDACTED] zoals bijvoorbeeld [REDACTED] in andere concentraties worden toegediend (beschreven in 2C). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [REDACTED] op de ziekte parameters.

Op basis van de uitkomst uit experiment 1 zijn de vervolggexperimenten beschreven in 2A, 2B en 2C waarbij de GO/NO-GO gekozen worden op de basis van gegevens uit de experimenten: moet voor herstel van het fenotype de [REDACTED] dan wel verlaagd worden in het [REDACTED] muis model. Als een gekozen aanpak niet werkt, zal deze aanpak niet verder onderzocht worden in deze bijlage noch andere bijlagen van het projectvoorstel.

### **Resultaten welke verwacht kunnen worden uit experiment 1**

**resultaat 1A:** 20% remming van de [REDACTED] (gebaseerd op genexpressie van [REDACTED] markers) en ziekte parameters (>50% verbetering op mobiliteitstesten) in de [REDACTED] muismodellen nemen af of blijven gelijk.

**Interpretatie:** Bij verbetering van de mobiliteits testen blijkt dat de [REDACTED] bijdraagt aan de klinische verschijnselen, histologische en moleculaire afwijkingen in de [REDACTED] muismodellen (tezamen aangeduid als "ziekte"). Indien er alleen remming van de [REDACTED] gevonden wordt, zonder verbetering in mobiliteitstesten blijkt dat [REDACTED] feitelijk beschermt tegen de ziekte maar mogelijk onvoldoende en dat [REDACTED] deze bescherming overneemt. Dit gebrek aan bescherming draagt bij aan de klinische verschijnselen, histologische en moleculaire afwijkingen in de [REDACTED] muismodellen.

**Vervolg na resultaat 1A:** bijdrage van [REDACTED]-geregleerde routes aan de ziekte verder ontrafelen met een genetische interventie (door gebruik te maken van genetisch gemodificeerde muizen, beschreven in 2A) en moduleren met een farmacologische aanpak (beschreven in 2B). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [REDACTED] op de ziekte parameters. Specifiek kan verder onderzocht worden met een dieetgerichte aanpak, die gebaseerd is op aanpassing (verlaging) van [REDACTED] als [REDACTED] (beschreven in 2C) of de ziekteverschijnselen verbeteren.

Indien beide parameters ([REDACTED] en ziekteverschijnselen verbeteren) is dat een NO-GO voor experiment 2C (wat een besparing van 1344 dieren zal opleveren). Doordat experiment I een duidelijk effect heeft op de [REDACTED] kunnen we in bij experiment 2A het aantal kruisingen beperken en worden 240 dieren bespaard.

**Resultaat 1B:** [REDACTED] beïnvloedt de [REDACTED] activiteit niet significant [REDACTED] [REDACTED] en deze activiteit is onvoldoende om de ziekte parameters te veranderen in de [REDACTED] muismodellen [**ziekte =**]. Het experiment levert geen bruikbare resultaten op die aantonen of de routes de ziekte veroorzaken of beschermend werken tegen ziekte.

**Vervolg na resultaat 1B:** In geval van resultaat 1B worden de [REDACTED] verder onderzocht door een [REDACTED] interventie met behulp van [REDACTED] [REDACTED] muizen stammen (beschreven bij experimentele opzet 2A) gecombineerd met een [REDACTED] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2B) of [REDACTED] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2C).

**Resultaat 1C.** Er is een kleine kans dat bij niet detecteerbare verlaging van de [REDACTED] door [REDACTED] de ziekte parameters wel significant verminderen. Dat kan bijvoorbeeld verklaard worden door een (onbekend) effect

van [REDACTED] mutatie op een cellulaire functie/moleculaire route, die gevoeliger wordt geremd door [REDACTED] dan de [REDACTED]. Onduidelijk blijft of [REDACTED] bij resultaat IV een gunstig effect had op de ziekte via [REDACTED] (on-target of specifiek effect) of via een nog onbekende target (off-target of aspecifiek effect). Deze onduidelijkheid zal dan worden onderzocht op patiënten materiaal.

**Vervolg na resultaat 1C:** In geval van uitkomst 1C worden de nieuw ontdekte functie/routes die [REDACTED] moduleren verder onderzocht op basis van dan beschikbare gegevens uit literatuur. Indien mogelijk kiezen we voor een [REDACTED] interventie zoals beschreven bij 2A, 2B en 2C. De interventie is er op gericht om de nieuw ontdekte functie/route zodanig te moduleren dat de ziekteverbetering geobserveerd bij [REDACTED] toediening bevestigd wordt en verder ontrafeld wordt. Wij zullen de specifieke details van de interventie dan uiteraard verder bespreken met IvD. Het aantal dieren, de mate van ongerief en het doel van de experimenten zal naar verwachting niet veranderen: de resultaten zullen uiteindelijk bijdragen aan inzichten die de ontwikkeling van een multimodale therapie ondersteunen.

**Resultaat vragen 2A, 2B, 2C:** Uit de vervolgresultaten gegenereerd in experimenten 2A, 2B en/of 2C wordt een geschikte moleculaire target voor [REDACTED] geïdentificeerd in de muismodellen. In dat geval willen we een laatste proef uitvoeren die sensitief de genexpressie meet in selectief die cellen die verantwoordelijk voor ziekte zijn zoals bepaald in bijlage 1 ([REDACTED]) en waarbij het [REDACTED] niet langer aanwezig is (bepaald in aanpak 2A). Deze proefopzet is beschreven bij vraag 3. We kunnen met dit experiment bevestigen of eerder vastgestelde afwijkingen in genexpressie cel-specifiek worden bevestigd en gecorreleerd kunnen worden aan ziekte parameters.

**Vraag 3:** Wat gaat er cel-specifiek mis als gevolg van de [REDACTED] mutatie op het niveau van [REDACTED] expressie en [REDACTED] en functies? Dit wordt onderzocht in een muismodel waarin de [REDACTED] cel-specifiek gelabeld zijn met een extra stukje [REDACTED]. Deze [REDACTED] staat toe dat we cel-specifiek de [REDACTED] bepalen in een kruising tussen de [REDACTED] [REDACTED] muizenlijn met de zieke [REDACTED] muis en eenzelfde kruising met de bij 2A gekruiste [REDACTED] [REDACTED] waarbij herstel optreedt. Uit deze gegevens kunnen we dan onomstotelijk vaststellen wat er [REDACTED] mis gaat als gevolg van de [REDACTED] mutatie op het niveau van genexpressie en [REDACTED] en functies. Door deze proef komen alle gegevens samen en beantwoorden we de onderzoeksvraag concreet (hoe mutaties in [REDACTED] leiden tot het [REDACTED], wittestofpathologie en klinische verschijnselen in [REDACTED] muizen). Voor ontwikkeling van een [REDACTED] kan dan verder gezocht worden naar een cel-specifieke moleculaire tool.

**Het resultaat van 2A, 2B, 2C en 3 samen zal tot identificatie van een moleculair therapeutische interventie leiden die geschikt is voor verdere ontwikkeling voor de humane patiënt.**

**Uitkomst parameters voor alle vragen (1, 2A-C en 3) in detail met in bold de primaire uitkomst parameters:**

*In vivo en ex vivo* zal onderzocht worden of mutant [REDACTED] een aangrijpingspunt is van o.a. [REDACTED]. Onderzocht zal worden of de gemoduleerde [REDACTED] en [REDACTED] routes de onderstaande parameters beïnvloeden. Na het vaststellen van een behandel-effect (of na de maximale behandelduur) worden de hersenen en overige organen (o.a. oog, ruggenmerg, hart, lever, alvleesklier, nieren, milt, testis/ovaria, dijbeenspier, stukje huid voor fibroblastenkweek) na cervicale dislocatie of na anesthesie en in-vivo perfusie uitgenomen voor verdere analyses.

- Klinische fenotypering door middel van dagelijkse observaties, wegen en [REDACTED] [REDACTED]. Zodra er een significant verschil wordt gemeten stopt het experiment.
- Pathologie van uitgenomen hersenen (immuun) histologie: [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED], [REDACTED];
- Genexpressie in hersenen (moleculaire analyses: [REDACTED] [REDACTED]);
- Genexpressie en celmorfologie in overige organen (bijv. lever, nieren en pancreas) voor analyses van eventuele neveneffecten van de interventies.

De bovengenoemde (vervolg) experimenten zijn hieronder opgesplitst in twee tabellen. **Tabel 1** beschrijft het nu al lopende experiment. **Tabel 2** bevat de interventies bij de hierboven besproken verschillende type

experimenten: [redacted] aanpak (2A), [redacted] interventies dmv kruisingen (2B) en [redacted] aanpak (2C). Experiment 2 omschrijft de samenvatting wat bij de interventie [redacted] wordt 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.

**Tabel 1: Interventies bij experiment 1: [redacted] modulatie van de [redacted]**

Interventie door middel van [redacted]	Toedienings- Route, frequentie	Behandelduur
[redacted] test groep* of controle groep	I.P. 1x per dag*	Max. 12 maanden
mobilitiestesten	Max. 4	Max. 5 minuten per test
Bloedafnames (wangprik of staart max volume enkele druppels)	Max. 2x, met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname

\*) **N.B. Nogmaals**, dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 ivm de fok van voldoende dieren voor experiment. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een (tijdrovend) amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

**\*Toelichting:**

Dieren worden dagelijks i.p. met [redacted] of controle vehiculum behandeld gedurende maximaal 6 maanden (voor de [redacted] muizen) of maximaal 12 maanden (voor de [redacted] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken (presymptomatisch). Er is ruime ervaring met het zeer langdurig i.p. injecteren van muizen, waarbij retrospectief samen met de IvD het ongerief op matig is vastgesteld. [redacted] wordt in zuivere vorm en in farmacologisch geschikt oplosmiddel toegediend, zodat verklevingen in de buikholte worden voorkomen. De [redacted] muis vertoont het [redacted] fenotype op een eerdere leeftijd waardoor effecten sneller zichtbaar zijn, maar ook de kans bestaat dat eerder een humaan eindpunt moet worden toegepast. De [redacted] muis vertoont het fenotype op een latere leeftijd, waardoor effecten pas na langere tijd duidelijk zichtbaar zijn.

**Tabel 2: Overzicht van behandelingen uitgevoerd in experimenten 2A, 2B, 2C en 3.**

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur
2A: [redacted] behandeling	injectie i.p. oraal of s.c.	1x daags	Max. 12 maanden
2B: [redacted] interventies	[redacted] muizenstammen; dagelijkse observaties	Mobiliteitstesten	1 jaar of HEP
2C [redacted] interventies	Aangepast [redacted]	Dagelijks	Max. 1 jaar
2A, 2B, 2C	mobilitiestesten	Max 4 x	5 minuten per test
2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max 2 x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname
2 A, 2B, 2C	Terminale anesthesie, uitname organen		
3	Toedienen [redacted] als [redacted] of [redacted] controle vehiculum	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden
3	[redacted] [redacted] [redacted]	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden
3	mobilitiestesten	Max 4 x	5 minuten per test
3	bloedafnames	Max 2 x (wangprik of	Max 5 minuten per



		staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	afname
3	Terminale anesthesie, uitname organen		

### Toelichting interventies:

- **Mobiliteitstesten (max licht ongerief)**

Mobiliteitstesten (o.a. ██████████) zoals door ons eerder gepubliceerd.

- **Bloedafname tbv analyse farmacon/dieet:** de concentratie farmacon wordt tijdens het experiment in bloed (afgenomen middels 1-2 wangprikken) bepaald en aan het einde in bloed en in de hersenen aan het einde van het experiment gemeten (terminaal bloedmonster).

- ████████  
Dieren worden met een ████████ behandeld waarin ████████ componenten zijn aangepast (bijvoorbeeld ████████) vanaf jonge leeftijd tot een leeftijd van maximaal 6 maanden (voor de ████████ muizen) of maximaal 1 jaar (voor de ████████ muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. De ████████ muis vertoont het VWM fenotype op een eerdere leeftijd waardoor effecten sneller zichtbaar zijn. De ████████ muis vertoont het fenotype op een later leeftijd, waardoor effecten pas na veel langere tijd duidelijk zichtbaar zijn. Dagelijkse tot wekelijkse observaties van de dieren afhankelijk van dieet (bij dagelijks voerafwegingen ook dagelijkse observatie van gewicht en diergedrag).

Toelichting: ████████ activiteit en de gereguleerde ████████ worden indirect gereguleerd door ████████. In een pilot hebben wij ████████ muizen 3 weken lang op een ████████ geplaatst (██████ ████████ ████████ ████████ ████████ ████████ ████████ ████████). Wij vonden toen geen ████████ in de hersenen, mogelijk als gevolg van 2 oorzaken: ████████ zijn onvoldoende ████████ of het ████████ is niet geschikt om ████████ in de hersenen te moduleren. Wij willen het experiment uitvoeren met een verdere verlaging van ████████ en verdere verfijning door ████████. In het kort komt dit neer op: start ████████ vanaf een leeftijd van 7 weken of ouder. Het gewicht van de muizen en dagelijkse tot wekelijkse voedselinname zal bijgehouden worden.

- **Ex-vivo analyses op breintjes** mbv (immuun) histologie en gen/eiwit analyses ████████ (██████). Breintjes worden histopathologisch geanalyseerd. Met de resultaten uit bovengenoemde experimenten kunnen we uitzoeken of de ████████ interventie gunstig of ongunstig zal zijn op ████████ pathologie.

### Toelichting experiment 3

We kunnen met de gegevens uit bijlagen 1, 2 (experimenten 2A-C) en 3 een verfijning aanbrenen in de genexpressie analyse om een duidelijke afwijking van een moleculaire route specifiek in de aangetaste cel-populatie in het ████████ brein (bepaald in bijlage 1). Deze kennis kan bijdragen aan een verdere ontwikkeling van de ████████ therapie. Het ontrafelen van deze ████████ afwijking kan bijvoorbeeld uitgevoerd worden via een kruising van de ████████ met een ████████ muizenlijn die conditioneel een label ████████ heeft. De conditionele aanpak is bepaald in bijlage 1. De ████████ kunnen we bijvoorbeeld middels kruising van ████████ specifiek tot expressie brengen in de primair aangedane cellen (in het geval van het ████████). Deze kruising staat toe dat we ████████. Dit experiment is conditioneel aan de bevindingen uit bijlage 1 (welk ████████ lijn bootst het best de ████████ ziekte in muizen na) en uit bijlage 2 (onderdeel 2A-C). In een pilot zullen we de specificiteit van de ████████ bepalen middels histologie. We zullen de lijn bij GO (voldoende ████████ expressie) door de tijd volgen en de analyses uitvoeren op 3 leeftijden (1-2 maanden [presymptomatisch], 4-5 maanden [mild symptomatisch], maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). Bij de laatste leeftijd zullen we ook mobiliteitstesten uitvoeren. Dit laatste experiment geldt als "proof of the pudding" waarbij eerder vastgestelde afwijkingen in ████████ worden bevestigd en ████████ gecorreleerd kunnen worden aan ziekte

parameters.

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

In het algemeen geldt voor de experimenten in deze bijlage:

N=16 per testgroep voor mobiliteitstesten (op grond van literatuur gegevens ( ), waarvan na afloop n=11 - 12 door cervicale dislocatie worden geëuthanaseerd voor moleculaire analyses en histologie op vers weefsel en n=4 voor perfusie onder anesthesie [voor histologische analyses] (totaal n=16). Het aantal zal worden bijgesteld als de data van het experiment 2A bekend zijn en opnieuw een powerberekening gemaakt kan worden.

#### **Power analyse van analyse van genexpressie voor pilot vermeld bij 2A:**

De analyse methode voor is het moeilijkst meetbaar voor target . Wij willen een verschil van 15% kunnen meten (wt en mutant verschillen zonder interventie 20% van elkaar). De standaard deviatie is 0,001772, gemiddelde expressie in dieren is 0,025667. Op basis van deze getallen komen wij op een noodzakelijk aantal dieren van 4.

#### **B. De dieren**

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

**Diersoort:** muis (mus musculus) en genetisch gemodificeerde dieren, afkomstig van leveranciers of onderzoeksgroepen of eigen fok.

##### **Muizenstammen:**

Controle stammen: C57BL/6J, ,

Kruisingen: C57BL/6J x test lijn, x test lijn en x test lijn

Testlijnen: bijvoorbeeld

Deze muizenlijnen hebben van zichzelf geen fenotype.

**Herkomst:** eigen fok of aanschaf via officiële leverancier of onderzoeksinstituut.

**Sekse:** mannetjes. Een van de parameters is

. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons inziens noodzakelijk.

**Tabel 3: Totaal aantallen dieren:**

Experimenten	Minimum aantal	Maximum aantal
1	68	68
2A	96	168 + 672
2B	96+48	720
2C	384	1344
3	12	12 + 96
<b>Totaal</b>	<b>704</b>	<b>3080</b>

Aantallen en levensstadia worden hieronder uitgelegd per experiment.

##### **Experiment 1:**

De dieren gebruikt in experiment 1 liggen vast (n=68 in totaal) omdat dit een lopend experiment betreft op een 'oude' vergunning (<14 dec 2014). De aantallen zijn hier wel meegenomen omdat het experiment waarschijnlijk doorloopt in 2018. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken en duurt maximaal 6 maanden voor en 12 maanden

##### **Experiment 2A:**

**Aantallen pilot:**

Per kruising van ██████████ en eventueel ██████████ x een gen-specifieke lijn (3 test lijnen) en 3 controle lijnen C57BL/6J, ██████████ en eventueel ██████████ (6 lijnen in totaal):

Groeps grootte: Pilot n=4, minimaal 4, maximaal 6 lijnen per kruising (maximaal 4x6=24 dieren).

Deze flow wordt minimaal voor 4 (bij resultaat 1D) en maximaal voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij Resultaat 1C) [Tabel 2a en 2b]. In totaal (alle kruisingen maximaal ingeschat):

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen, pilots  $6 \times 4 \times 5 = 120$  muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen Pilots  $6 \times 4 \times 7 = 168$  muizen;

### Aantallen karakterisering nieuwe lijnen:

Controle lijnen: C57BL/6J, ██████████ en ██████████

Testlijnen: C57BL/6J x test lijn, ██████████ x test lijn en ██████████ x test lijn

Groeps grootte:

Aantal dieren voor overleving en mobiliteitstesten is n=16 per groep. Deze flow wordt maximaal voor vijf kruisingen (bij Resultaat 1A of 1C) of voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij GO Resultaat 1B).

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen,  $6 \times 16 \times 5 = 480$  muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen:  $6 \times 16 \times 7 = 672$  muizen;

Als twee of meer lijnen tegelijk gekruist kunnen worden, kunnen de F1 van de kruisingen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 controle groep. Deze opzet vermindert het aantal dieren met 48 (1 controle groep is 48). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten of de kruisingen tegelijk kunnen worden uitgevoerd.

In de lijnen worden de ziekteparameters onderzocht vanaf een jonge leeftijd tot een maximale leeftijd (1 jaar voor ██████████ en C57BL/6J en 6 maanden ██████████) of eerder bij humaan eindpunt.

### Experiment 2B:

Per experiment 3 behandelingen: 2 controle (vehiculum en farmaconspecificiteit) en 1 testbehandeling (stof als ██████████). Gebruikte Lijnen: 2 Testlijnen: ██████████ en ██████████: n=16 (mobiliteitstesten) per groep, 2 Controle lijnen: C57BL/6J en bijv ██████████ x target-gen omlaag: n=8 per controle groep per behandeling, Aantal dieren is maximaal:  $3 \times 2 \times 16 = 96$  dieren (test) en  $3 \times 2 \times 8 = 48$  (controle) is totaal maximaal 144 dieren per experiment. Er zullen maximaal 5 verschillende experimenten worden uitgevoerd:  $144 \times 5 = 720$  dieren. Als een vehiculum gedeeld kan worden (████████████████████), kunnen 2 stoffen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 vehiculum injectie controle groep. Dit scheelt dan 48 dieren (2 controle groepen van 8 en 2 lijnen uit test groep van beide 16 =>  $2 \times 8 + 2 \times 16 = 48$ ). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten welke stoffen we gaan testen.

### Experiment 2C:

Per experiment 3 lijnen: 1 controle lijn: C57BL/6J en 2 test lijnen: ██████████ en ██████████ Dieraantallen: n=16 (mobiliteitstesten / overleving per groep).

Behandelingen: Maximaal 18 test behandelingen, zoals bijv. dieet eiwitverlaging >30% (2 concentraties) en dieet zonder essentieel aminozuur (4 aminozuren, 4 verschillende concentraties).

Minimaal 2 maximaal 10 controle behandelingen: normaal dieet, calorisch afgestemd dieet.

Mogelijk is het niet logistiek haalbaar om dit in 1 experiment uitvoeren en zullen we het experiment opsplitsen in 5 onderdelen (per onderdeel 2 eiwitconcentraties of 1 aminozuur in 4 concentraties). Het aantal controle behandelingen neemt dan toe van 2 naar 10.

Totaal aantal dieren is minimaal (alles parallel, met gedeelde controle behandelingen):

3 lijnen x 20 behandelingen x 16 dieren (n=960)

Totaal aantal dieren is maximaal (5 rondes, met 10 controle behandelingen):

3 lijnen x 28 behandelingen x 16 dieren (n=1344)

### Experiment 3:

Ribotag met 3 testlijnen:

██████████ x ██████████, C57BL/6J x ██████████, Lijn 2A x ██████████ x conditionele-CRE x ██████████ en 3 controle lijnen (alleen voor pilot): ██████████, C57BL/6J en de lijn die uit 2A komt (Lijn 2B x  $2b5^{ho}$ )

- Pilot experiment (is ██████████ celspecifiek en beïnvloedt de ██████████ de expressie van de ██████████ Per groep: 2 dieren per lijn, 1 leeftijd 4-5 maanden oud. Histologische analyse (aantonen

of de cellen specifiek de ██████ tot expressie brengen). Aantal dieren is 2 dieren x 6 lijnen=12 dieren.

- **Als** de ██████ zoals verwacht ██████ komt en geen onverwacht ongerief geeft, **dan** zal ██████ analyses in hersenen van mannelijke dieren worden uitgevoerd op de 3 testlijnen, met 8 dieren per lijn, 2 leeftijden ((1-2 maanden [presymptomatisch], 5 maanden [mild symptomatisch], en 16 dieren voor mobiliteitstesten per lijn bij leeftijd maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). 8 dieren zijn naar alle waarschijnlijkheid nodig voor het isoleren van ██████ (eerder hebben we ██████ op heel brein ██████ uitgevoerd op n=4). Aantal dieren is 8 dieren x 3 lijnen x 2 leeftijden + 16 x 3 x 1 leeftijd= 96 dieren.

### 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:

██████ is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van ██████ patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast is het niet wettelijk toegestaan noch ethisch verantwoord om ██████ bij mensen toe te passen indien proefdieronderzoek niet heeft uitgewezen dat de middelen veilig en effectief zijn. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (██████); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

#### Vermindering:

Bij het creëren van nieuwe lijnen door kruisingen (2A, 3) zal een Pilot experiment in n=4 per lijn worden uitgevoerd om afwezigheid van extra ongerief te bevestigen. We beslissen dan of de ██████ lijn ██████ noodzakelijk is om te genereren, waarbij we snel tot een keuze komen welke genetisch gemodificeerde muizen voor verdere analyses gebruikt worden.

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Door kruisingen van verschillende lijnen tegelijk uit te voeren kunnen we het aantal controle dieren terugbrengen met 48. Bij farmacologische interventie studies zal waar mogelijk een naïeve, onbehandelde groep (controle groep) dier worden weggelaten indien ook een groep dieren met een passend vehiculum als saline wordt meegenomen. Dit alles zal met de IvD worden afgestemd.

#### Verfijning

Zodra blijkt dat fenotypische veranderingen na interventie significant worden waargenomen zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar wordt.

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.

Het neurologisch fenotype van muizen met █████ uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren makkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

## 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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

## 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.

Mannelijke dieren worden solitair gehuisvest ivm onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het dagelijks i.p. behandelen wordt door zeer ervaren biotechnici uitgevoerd, waarbij is vast gesteld dat het meeste ongerief wordt veroorzaakt door oppakken van de dieren. Retrospectief werd daarbij het ongerief op maximaal matig (na maanden toedienen) vastgesteld. Er worden geen complicaties verwacht doordat de farmaca zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken farmaca ongerief veroorzaken. Het fenotype █████ is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Kenmerken van █████ ziekte in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water) en geringe gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren. Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.

De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

## 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.

- Maximaal dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren.
- Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
- De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

Het fenotype █████ is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Bij het samenstellen van het werkprotocol zal hier gedetailleerd over gecommuniceerd worden met de IVD.

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

Ca. 20%: zou maximaal verwacht kunnen worden bij ██████████ ██████████ die worden behandeld met controle ██████████ of vehikel of die geen genetische aanpassing hebben.

## 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.

**Inschatting ongerief per experiment:**

**Tabel 4: Inschatting ongerief per handeling:**

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur	Maximaal ongerief
1 & 2A: ██████ behandeling	injectie i.p. oraal of s.c.	1 * daags	Max 12 maanden	Licht of matig; afhankelijk van de duur. Zodra er een effect wordt gezien stopt de behandeling
2B: ██████ interventies	█████ muisenstammen; dagelijkse observaties	Motorische testen	Max. 12 maanden	licht
2C ██████ interventies	Aangepast ██████	Dagelijks	Max. 1 jaar	licht
1, 2A, 2B, 2C	mobiliteitstesten	Max. 4x	5 minuten per test	licht
1, 2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max. 2x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname	licht
1, 2 A, 2B, 2C	Terminale anesthesie, uitname organen			Maximaal licht
3	Toedienen ██████ █████ of controle vehiculum	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden	licht of matig; afhankelijk van de duur. Zodra er een effect wordt gezien stopt de behandeling
3	█████ ██████ █████ ██████ █████	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden	licht
3	mobiliteitstesten	Max. 4x	5 minuten per test	licht
3	bloedafnames	Max. 2x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname	licht
3	Terminale anesthesie, uitname organen			
1, 2A, 2B,2C, 3	Fenotype als gevolg van mutatie	Geen	Max 12 maanden	Licht of matig, afhankelijk van genotype en duur experiment

**Tabel 5: Maximale cumulatieve ongerief in % van gebruikte dieren in deze bijlage**

Aantal dieren	% met ongerief "licht"	% met ongerief "matig"
Maximaal 3080	Max. 60%	Max. 40%

De behandelingen zijn in principe gericht op verbetering van het fenotype van ██████ en ██████ lijnen.

Vóórdat ernstig ongerief optreedt zullen de muizen geëuthanaseerd worden (=HEP), het totale ongerief is dus maximaal matig.

**Einde experiment**

**L. Wijze van doden**

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

Nee

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

De hersenen moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyse.

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

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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   |
|------------|--|
| 3          | Verbetering van <input type="text"/> functie: ex-vivo analyses na <input type="text"/> in celkweek |
- 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.

We willen de mRNAs/eiwitten opsporen die een veranderde expressie vertonen in muizen met  ten opzichte van wild-type (WT) dieren, omdat deze mogelijk een rol spelen bij de ziekte. Dit gebeurt met ex-vivo analyse van patienten matereiaal en in parallel met muizen materiaal.

#### Ex-vivo onderzoek op hersenen van onbehandelde muizen met en WT controles:

**A1&3:** Ex-vivo (in celkweek) worden de volgende parameters onderzocht op coupes van hersenen uit muizen :

- de mate van schade, ,
- specifiek de mate van  uitrijping in celkweken met ;
- door karakterisatie van celmorfologie en  door middel van fluorescentie immunohistochemie.

**A2:** Ex-vivo  analyse met behulp van  uit muizen van verschillende leeftijden/ziektestadia in .

- Eiwit detectie welke differentieel tot expressie worden gebracht . Hierbij wordt bepaald welke eiwit(ten) veranderd is (zijn), .
- **Belangrijk is de translacionele aanpak:** Om de resultaten die we in de muizen vinden te

valideren zullen we eenzelfde [redacted] protocol uitvoeren op menselijk materiaal ([redacted]) en onderzoek doen naar het proteoom van [redacted].

**B:** Wat is de impact van [redacted] op innate immuun cellen (mbv celkweek): uitleesparameters: [redacted] wordt bepaald met immuun fluorescentie, [redacted]. Daarnaast zullen de zelfde experimenten worden uitgevoerd met primaire [redacted] van patiënten en controles; de cellen zijn al aanwezig in het lab.

**C:** Wat is de impact van [redacted] op de Bloed Hersen Barrière (BHB)? Dit betreft ex-vivo onderzoek op breintjes van muizen met [redacted]. Uitleesparameters: verschillende parameters [redacted].

**D1** Bestudering van [redacted] na behandeling [redacted]. Primaire uitkomst parameters: astrocytaire levensvatbaarheid, morfologie, reactiviteit en proliferatie kwantificatie met behulp van [redacted]. 3D kweken zijn geschikt voor al deze doeleinden en de technieken en analyses al geoptimaliseerd.

**Go / no-go:** als AI en AII geen significant resultaat laat zien

**A4: In-vivo** inductie het [redacted] in vivo bestudeerd bij [redacted] en WT muizen waarbij myelineschade door lokale steriele in het corpus callosum en de cerebellaire witte stof met een standaard protocol<sup>1</sup> met [redacted] of 2µl PBS (controle) i geinduceerd.

- Uitleesparameters: ex-vivo op hersen materiaal:
  - cellulaire veranderingen zijn ([redacted]) dagen na [redacted] tijdstippen zijn gebaseerd op de bekende timeline van [redacted] in muizen.
  - Differentiële expressie van geselecteerde eiwitten

## **In-vivo onderzoek op hersenen van behandelde muizen met [redacted] en [redacted]**

**D2: in-vivo:** onderzoek naar [redacted] vs. controle dieren. Uitkomst parameters: [redacted] op coupes van hersenen. Na de behandeling wordt per tijdstip een deel van de muizen geëuthanaseerd en zullen de hersenen histologisch worden onderzocht.

**Haalbaarheid:** Alle noodzakelijke apparatuur is beschikbaar, en technieken en analyses zijn al geoptimaliseerd. Daarnaast zal de differentiële expressie in [redacted] en [redacted] muizen van [redacted] ook in het [redacted] uit punt A bevestigd worden. We willen muizen van verschillende leeftijden analyseren ([redacted]).

**Translatieel:** Daarnaast worden dezelfde experimenten uitgevoerd met [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] patiënten en controles. Deze cellen zijn al aanwezig in het lab om de muisdata met de humane situatie te vergelijken en de ziekte-specificiteit van de bevindingen te bepalen.

Wij verwachten dat [REDACTED] [REDACTED]. Wij zullen aantonen of een afwijkende eiwitexpressie hieraan ten grondslag ligt.

**Humaan:** de bevindingen van bovengenoemde experimenten zal worden bevestigd in menselijke [REDACTED] hersenweefsel en de specificiteit zal worden beoordeeld door [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED].

**Uit de experimenten uit bijlage 3 moet duidelijk worden welke [REDACTED] responses en bepalen.**

**Referenties:**

- [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]
- [REDACTED]  
[REDACTED]
- [REDACTED]  
[REDACTED]
- [REDACTED]  
[REDACTED]
- [REDACTED]  
[REDACTED]

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.

Het betreft hier bijna volledig ex vivo analyses, op muizen in verschillende ziekte stadia (leeftijd) met wild type controles. De enige handeling, welke hier van toepassing is, is het doden van dieren op verschillende leeftijden om weefsel voor ex vivo analyses te verzamelen.

**Tabel 1: overzicht behandelingen, frequentie en duur per experiment**

Experiment	Handeling	Duur	Frequentie
A1, A3	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
A2, A4	[REDACTED] onderanesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Uitname organen na terminale anesthesie op verschillende leeftijd		
B	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
C	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
D1	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
D2	Of: [REDACTED]	Kort, seconden	Eenmalig
	Of: [REDACTED] onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	uitname organen na terminale anesthesie op		

verschillende leeftijd		
------------------------	--	--

**Uitleg van behandelingen:****Dieren waarin ook in-vivo handelingen worden verricht:****Experiment A4: ██████████ in vivo (alleen als A2 en A3 geen duidelijk resultaat laat zien)**

Eenmaal intracraniale behandeling ██████████.

Gebruik van ██████ en █████ muizen ██████████).

Gebruik van mannelijke dieren ██████████, en van dieren van beide geslachten voor ██████████).

**Experiment D1: 3D in vitro model van reactieve gliose**

Geen behandeling in vivo, alleen uitname breinen onder terminale anesthetie.

Gebruik van ██████ en █████ muizen ██████ van beide geslachten. ██████████

**Experiment D2: ██████████ in vivo**

Eenmalig behandeling ██████████

██████████ zal een deel van de muizen worden geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie en zullen de hersenen worden ingevroren of in paraffine ingebed voor microscopisch onderzoek. ██████████

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

Uit ervaring en uit literatuurgegevens zijn de berekende aantallen gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die nodig is voor de ex-vivo analyses per parameter. Daar waar mogelijk worden meerdere parameters in een brein onderzocht. .

Voor poweranalyse: alpha 0.05, 1-beta 0.8, Zalpha/2 1.96, Zbeta 0.84.

**Punt A1: ██████████ behandeling van organotypische hersenplakken.**

Hersenplakjes van 300um; parameters: ██████████.

$n\text{-needed} = 2 * ((Z\alpha/2 + Z\beta) * SD\ 0.1 / \text{diff}\ 0.1)^2 = 16$

**Punt A2: ██████████.**

Isolatie van ██████████ ██████████

3 experimenten, 7 levenstadia, 3 breinen = 63 breinen per genotype (geen statistische overwegingen)

Validatie experimenten (██████████)

4 breinen (██████████)/genotype

7 levensstadia/genotype

21 breinen per genotype

$n\text{-needed} = 2 * ((Z\alpha/2 + Z\beta) * SD\ 0.05 / \text{diff}\ 0.1)^2 = 4$  **voor validatie**

**Punt A3: a ██████████ co-kweken.**

De ██████████ worden uit ██████████ pups geïsoleerd (beide geslachten). Bij het aantal muizen wordt voor 1 ██████ nestje, 1 muis (moeder) gerekend. Een ██████ nestje (gemiddeld 6 pups) geeft  $\sim 6 \times 10^7$  cellen. Na sortering blijven er  $\sim 1.8 \times 10^6$  ██████████ cellen over. Om genoeg ██████ cellen te genereren voor 1 experiment hebben we naar verwachting 2 ██████ nestjes nodig. ██████████ worden geïsoleerd uit ██████████

Herhaling van experiment (n): 4

Aantal muizen: (4 (n) x 2 (nestjes; [redacted] x 2 (nestje: WT + [redacted])) = 16 muizen

n-needed =  $2 * ((\alpha/2 + Z\beta) * SD \ 0.1 / \text{diff } 0.1)^2 = 16$

#### **Punt A4: [redacted] behandeling in vivo.**

[redacted] (mannelijke dieren): 9 breinen (zie boven) x genotype ([redacted] en WT) x tijdstip (voor behandeling en [redacted] na behandeling) x behandeling ([redacted]).

Immuunhistochemische karakterisatie en [redacted]: 6 half breinen x genotype ([redacted] [redacted]) x tijdstip [redacted] x behandeling [redacted] x experiment ([redacted]), dezelfde brein kan gehalveerd worden en gebruikt voor beide doelen.

n-needed =  $2 * ((\alpha/2 + Z\beta) * SD \ 0.34 / \text{diff } 0.1)^2 = 180$  [redacted] [redacted] [redacted]

n-needed =  $2 * ((\alpha/2 + Z\beta) * SD \ 0.34 / \text{diff } 0.17)^2 = 60$  voor validatie proteoom analyse

#### **Punt B: [redacted] co-cultures.**

We hebben [redacted] weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

Voor immuunhistochemie: totaal 18 eiwitten, 3 eiwitten samen kleuren → 6 kleuringen; 1 time point; 4

genotype combinaties: [redacted]

[redacted]; N=3; 3 experimenten:

→ 1 time point x 6 kleuringen x 3=N x 3 experimenten = 54 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 6 kleuringen x 3=N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 216 wells totaal = 9 x 24-well plates totaal

[redacted] 1 time point; 4 condities/genotype: [redacted]

[redacted]; N=3; 3 experimenten:

→ 1 time point x 3 N x 3 experimenten = 9 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 3 N x 3 experimenten x 4 genotype combinatie = 36 wells totaal = 1.5 x 24-well plates totaal

[redacted]: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype

combinaties: [redacted]

[redacted]; N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal = 5 x 24-well plates totaal

[redacted]: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype

combinaties: [redacted]

[redacted]; N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal = 5 x 24-well plates totaal.

Totaal punt B: Minstens 21 x 24-well plates 123 wells / genotype combinatie; totaal 4 combinaties

→ Totaal 246 wells / genotype ([redacted])

1 muis pup = ca.  $3.5 \times 10^6$  cellen, max passage (P) 2: plate 30.000 cellen/well P0-1, plate 50.000 cellen/well P2. Nodig  $246 \times 50.000 = 12.3 \times 10^6$  cellen, 1 P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca.  $24.5 \times 10^6$  cellen, dus 1 nestje nodig voor een experiment. De fok voor null/null ([redacted] is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted]) x null/null ([redacted]) Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ([redacted]) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.

Om de drie experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes / genotype (7

pups/nestje) → 21 pups / genotype = 21 WT + 21 homozygote  $\square\square$  + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

### **Punt C1: a $\square\square$ co-cultures.**

We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

$\square\square$  3 experimenten x 6 tijdstippen ( $\square\square$ ) x 2 genotypen ( $\square\square$ ) x N=3: 4.5 x 24 well plates.

$\square\square$ : 3 experimenten x 6 tijdstippen ( $\square\square$ ) x 2 genotypen ( $\square\square$ ) x N=3: 4.5 x 24 well plates.

$\square\square$ : 2 experimenten x 6 tijdstippen ( $\square\square$ ) x 2 genotypen ( $\square\square$ ) x N=3 x 6 kleuringen: 18 x 24 well plates.

$\square\square$ : 3 experimenten x 6 tijdstippen ( $\square\square$ ) x 2 genotypen ( $\square\square$ ) x N=2: 15 x 24 well plates.

Totaal 450 wells per genotype, 900 wells voor beide genotypen = 38x24 well plates, 1 muis pup = ~ 3,5 x 10<sup>6</sup> cellen. Passage 2: plate 30.000 cellen / well passage 0-1, 50.000 cellen / well passage 2. Noodzakelijk 450 x 50.000 = 22,5 x 10<sup>6</sup> cellen per genotype, 1 P1-3 nestje geeft ~ 7 pups, 7 x 3,5 x 10<sup>6</sup> cellen = 24.5 x 10<sup>6</sup> cellen. De fok voor null/null ( $\square\square$ ) is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ( $\square\square$ ) x null/null ( $\square\square$ ). Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ( $\square\square$ ) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment. Om alle experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes (7 pups/nestje) / genotype = 21 WT + 21 homozygote  $\square\square$  + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

### **Punt C2: onderzoek naar $\square\square$ in vivo/ex vivo, $\square\square$ .**

Gebruik van dieren van beide geslachten;  $\square\square$ ; euthanasie door cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.

$\square\square$ : 10 halve breinen x genotype ( $\square\square$ ) x 3 leeftijden ( $\square\square$ ): 10 X 2 X 3 = 60 halve breinen = **30 breinen** ( $\square\square$ ).

n-needed = 2\*((Zalpha/2+Zbeta)\*SD 0.2/diff 0.25)^2 = **10**

$\square\square$ : 3 breinen x genotype ( $\square\square$ ) x 3 leeftijden ( $\square\square$ ): 3 X 2 X 3 = **18 breinen** ( $\square\square$ ).

n-needed = 2\*((Zalpha/2+Zbeta)\*SD 0.1/diff 0.25)^2 = **3**

$\square\square$ : 9 breinen (zie boven) x genotype ( $\square\square$ ) x 3 leeftijden ( $\square\square$ ): 9 X 2 X 3 = **54 breinen** (27  $\square\square$ , 27 WT).

n-needed = 2\*((Zalpha/2+Zbeta)\*SD 0.26/diff 0.35)^2 = **9**

### **Punt D1: $\square\square$ in vitro model van $\square\square$ .**

Gebruik van  $\square\square$  en  $\square\square$  muizen,  $\square\square$ , van beide geslachten, geëthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

$\square\square$ : totaal 18 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren → 9 kleuringen (9 plakjes); 4 tijdstippen ( $\square\square$ ); 2 condities: ( $\square\square$ ); 2 genotypen ( $\square\square$ ); N=3; 3 experimenten:

→4 tijdstippen x 9 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 648 secties/genotype ; 2 secties per well; 324 wells; = **18** x 24-well platen per genotype

→18 platen x 2 genotypen (WT,  $\square\square$ ) = 36 x 24-well platen totaal

$\square\square$ : totaal  $\square\square$  eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 4 tijdstippen ( $\square\square$ )

2 condities: ( $\square\square$ ); 2 genotypen ( $\square\square$ ); N=3, 3 experimenten:

→4 tijdstippen x 5 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 240 kleuringen/genotype 240 = 20\* 12 wells platen nodig (equivalent aan ongeveer **40** 24 wells platen) per genotype

→40 24 wells platen x 2 genotypen ( $\square\square$ ) = 80 x 24-well platen totaal

$\square\square$ : 4 tijdstippen ( $\square\square$ ) 2 condities: ( $\square\square$ )

██████████; 2 genotypen (██████████); N=3; 2 experimenten:  
 →4 tijdstippen x N=3 x 2 experimenten x 2 condities/genotype = 48 samples/genotype ; 1 sample kost 1  
 10 cm plaat is equivalent aan ~36 x 24 wells platen/genotype  
 →**1728** x 24 well plates x 2 genotypen (██████████) = 3456 x 24-well plates totaal

**Voor alle hierboven genoemde experimenten:**

Totaal minstens 1786 x24-well platen, totaal 42864 wells / genotype  
 50.000 cellen/well (passage P2).

Totaal aantal cellen is 42864 x 50000= 2143,2 X10<sup>6</sup> cellen/per genotype

1 muis pup = ca. 3.5X10<sup>6</sup> cellen

**613 pups nodig per genotype** = 613 WT + 613 homozygote ██████████ + 613 heterozygote pups + 88 moeders.

P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca. 24.5x10<sup>6</sup> cellen dus 88 nestjes per genotype nodig voor alle experimenten. De fok voor null/null (██████████) is niet anders uitvoerbaar dan null/wt (██████████) x null/null (██████████). Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null (██████████) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.

**Punt D2: ██████████ in vivo**

Gebruik van mannelijke dieren of beide geslachten afhankelijk van de experiment; ██████████; cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.

**Isolatie van ██████████**; ongeveer 50 cellen kunnen geïsoleerd worden uit een 6um-dik plakje, ongeveer 20 plakjes kunnen gesneden worden uit een brein; 3000 cellen (dus 3 hele breinen) noodzakelijk per sample voor mass-spectrometrie (n=1 bepaling).

3 experimenten x 2 genotype (██████████ en ██████████ x 2 tijdstip (██████████) x 4 behandeling (██████████). **24 dieren per genotype**

██████████ - ██████████ - ██████████ - ██████████ - ██████████ - ██████████ : 4 breinen ██████████  
 (██████████) x 2 genotype (██████████ ██████████) x 5 tijdstip (██████████)  
 ██████████ x 4 behandeling (██████████)  
 ██████████ **80** dieren per genotype  
 n-needed = 2\*((Zalpha/2+Zbeta)\*SD 0.05/diff 0.1)^2 =4 **voor validatie**

**B. De dieren**

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

Muis, *mus musculus*; Wild type: C57Bl/6J en Homozygote ██████████ ██████████ ██████████ (██████████). Beide stammen worden gefokt in het proefdiercentrum. Voor uitname pups op ██████████ worden de pups via hysterectomie bij de moeder uitgenomen. De moeder wordt na de hysterectomie onder anesthesie onmiddellijk gedood. Pups (P0-P2) worden spontaan geboren.

Tabel 2: berekening aantallen dieren

experiment	soort	sexe	leeftijd	aantal
A1	██████████	beide	perinataal	16
	wt	beide	perinataal	16
A2	██████████	Man*	██████████,	180
	wt	man*	██████████,	180
A3	wt	beide	██████████	16

		beide	E18	16
A4		beide	Moederdier voor A1 & A# voor behandeling en ██████ ████████ na behandeling	10 240
	wt	beide	voor behandeling en ██████ ████████ na behandeling	240
B		beide	P0-P3	21
		beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C1		beide	P0-P3	21
		beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C2		beide	████████████████████	51
	wt	beide	████████████████████	51
D1		beide	P0-P3	613
		beide	P0-P3	613
	wt	beide	P0-P3	613
D2		beide	██ ████████████████████	102
	wt	beide	██ ████████████████████	102
			<b>totaal:</b>	<b>3185</b>

Totaal aantal dieren voor deze bijlagen: 3185 dieren

\*)

Door verschillen in o.a. eiwitexpressie van X en Y chromosomen is statistische analyse van deze experimenten ondoenlijk als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons inziens noodzakelijk.

### 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:**

Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan [REDACTED] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met [REDACTED] van patiënten [REDACTED]). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. [REDACTED] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [REDACTED] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen. [REDACTED] de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

#### **Vermindering:**

De groepsgrootte is statistisch bepaald of gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die ex-vivo nodig is voor de analyses. Waar mogelijk worden breintjes gedeeld voor meerdere parameters.

#### **Verfijning**

Het betreft bijna uitsluitend onderzoek ex-vivo omdat we instaat zijn verfijnd onderzoek uit te voeren [REDACTED]. We hebben in onze groep veel ervaring met [REDACTED] in het kader van de ontwikkeling van [REDACTED]

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.

Het neurologisch fenotype van muizen met [REDACTED] uit zich als een [REDACTED]. De muizen hebben dan problemen met [REDACTED]. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren gemakkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente [REDACTED] op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

## **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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

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

Adequate anesthesie en perioperative pijnbestrijding zal worden toegepast bij bv [REDACTED] [REDACTED] en zal in het werkprotocol (OZP) worden afgestemd met de IvD.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Kenmerken van [REDACTED] ziekte in muizen: [REDACTED].

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De [REDACTED] is een typisch verschijnsel van een [REDACTED] en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de [REDACTED] uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van [REDACTED] van de dieren.

Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.

De [REDACTED] afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). [REDACTED] Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt ([REDACTED]).

### 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.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt ([REDACTED]).

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

~ 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.

- [redacted] onder anesthesie: matig
- Muis met fenotype (mild of matig, dit wordt achteraf bepaald en is nu als maximaal matig weergegeven) of toepassen HEP ivm progressie van aangetast fenotype: matig (om ernstig te voorkomen)
- Uitname breintjes onder anesthesie: licht

**Tabel 2: aantallen dieren en inschatting maximaal ondervonden ongerief**

Experiment	Licht	Matig
A1	32	
A2	280	80*
A3	42	
A4	480	
B	63	
C1	63	
C2	102	
D1		1839
D2	102	102

\* Dit betreft muizen met ongerief als gevolg van behandeling en/of fenotype bij de [redacted] muizen.

Het cumulatieve ongerief is licht voor 1164 muizen (~ 37%).  
 Het cumulatieve ongerief is matig voor 2021 muizen (~ 63%).

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het isoleren van de verschillende celtypen uit de breintjes

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	<input type="text"/>				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	<input type="text"/>				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Behandeling van <input type="text"/> in muizen met stamcellen, en/of combinatie therapie (van stamcellen, farmacologische modulatie van micromilieu en <input type="text"/>)</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	4	Behandeling van <input type="text"/> in muizen met stamcellen, en/of combinatie therapie (van stamcellen, farmacologische modulatie van micromilieu en <input type="text"/> )
Volgnummer	Type dierproef					
4	Behandeling van <input type="text"/> in muizen met stamcellen, en/of combinatie therapie (van stamcellen, farmacologische modulatie van micromilieu en <input type="text"/> )					

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

is aanwezig in alle regio's van de hersenen, maar varieert in ernst in de diverse fenotypen.

Onderzoek in muismodellen heeft laten zien dat  van  kunnen geven<sup>1</sup>. Vervanging van de niet-functionerende  in patiënten met  biedt dus therapeutische mogelijkheden. Deze therapie is echter nog in een , niet getest in muismodellen voor de humane ziekte en nog niet geschikt voor toepassing in patiënten.

Op dit moment hebben we met muismodel met de mutatie in  een model dat de humane ziekte klinisch goed weergeeft. Eerste experimenten in ons lab hebben aangetoond dat we ook in staat zijn om in dat model de .

Daarnaast hebben we de ) en ) technologie geïntroduceerd die de mogelijkheid biedt om een verbeterde  populaties te maken.  is een nieuwe technologie die het mogelijk maakt om .

De patiënt  of  kunnen we vervolgens differentiëren naar onze cellen van interesse,  Een belangrijk voordeel van  is, dat we niet meer afhankelijk zijn van  die ethische problemen met zich brengen en dat  derivaten niet worden afgestoten door de patiënt na  Naast het meer fundamentele onderzoek beschreven in bijlagen 1 – 3 zal dit onderzoek zich dus richten op de behandeling van  met behulp van .

Er zal gebruik gemaakt worden van de [redacted], verder te noemen [redacted] (wanneer resultaten van de resultaten uit bijlage 1- 3 daar aanleiding toe geven).

Gezonde [redacted] cellen, afkomstig uit controle muizen [redacted]) of geproduceerd via de [redacted] zullen [redacted] worden [redacted] om zodoende te kunnen uitgroeien tot functionele [redacted] die wel in staat zijn om de aangetaste [redacted] te repareren.

De effectiviteit van de behandeling wordt gemeten door het verbeterde motorisch gedrag te meten op volwassen leeftijd. Daarnaast zullen de dieren op verschillende tijdstippen na de [redacted] worden geëuthanaseerd. De hersenen zullen deels vers verzameld worden voor de analyse van veranderingen in [redacted] en [redacted], maar deels ook [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted].

Daarnaast kan farmacologische therapie van [redacted] invloed hebben op [redacted] en onderdeel zijn van behandeling. Tenslotte hebben recente onderzoeken aangetoond dat een [redacted] [redacted] kan bijdragen aan slecht herstel van de [redacted] en dat [redacted] therapie nieuwe perspectieven biedt voor hersenaandoeningen.

Bekende [redacted] componenten in het micromilieau van [redacted] patiënten, als ook nieuwe gegevens over [redacted] [redacted] uit onderzoeken beschreven in bijlagen 1 – 3, worden getarget om de uitkomst van [redacted] te verbeteren. Ook zullen de effecten van [redacted] correctie in vivo, mbv [redacted] van lentivirale vectoren die een normaal [redacted] tot expressie brengen, worden getest. Farmacologische behandeling en [redacted] zal voor, tijdens of na [redacted] worden toegepast. De dieren worden geanalyseerd zoals hierboven beschreven.

#### **Fenotype in de gebruikte dieren in vergelijking met de humane patiënt:**

Bij mensen veroorzaken homozygote mutaties in [redacted] (autosomaal recessief overerfend) een [redacted]. Menselijke dragers (ouders, eventuele drager-familieleden) hebben geen verschijnselen. Alleen personen die twee mutaties hebben, krijgen de ziekte. [redacted] leidt vooral tot een verlies van motorische vaardigheden (vooral stoornis van de coördinatie = ataxie). De cognitieve vaardigheden zijn relatief gespaard. [redacted] leidt tot vroegtijdig overlijden, vaak na een periode van coma. Het ongerief bij [redacted] patiënten is gering; de motorische afwijkingen geven geen pijn maar de belasting is zeer ernstig door de beperkingen. Als de ataxie op jonge leeftijd ontstaat, ervaren de kinderen hun motoriek als "normaal". Bijna alle patiënten hebben epilepsie, soms een status epilepticus. Aangezien epileptische aanvallen bij [redacted] vrijwel altijd met verlies van bewustzijn gepaard gaan, merken patiënten over het algemeen niets van hun aanvallen.

- Muizen met één mutatie zullen, net als menselijke dragers, naar verwachting geen enkel ongerief ondervinden. Voor [redacted] is de verwachting dat muizen die twee mutaties hebben vooral motorisch ongerief ondervinden.
- Bij de [redacted] ( [redacted] ) muizen beginnen de motorische veranderingen pas na [redacted] maanden. Op dat moment is het ongerief gering. De dieren verzorgen zichzelf goed, eten normaal en planten zich voort. Op [redacted] maanden, worden de dieren wel uit de fok gehaald.
- Dieren worden vanaf [redacted] maanden extra gemonitord. Extra monitoren houdt in dat de dieren wekelijks worden 1) gewogen; 2) onderzocht op verzorging, huid en staart; 3) [redacted], [redacted]. Dit wordt bijgehouden in een logboek. Bij belangrijke gewichtsafname (meer dan 15% van eigen lichaamsgewicht in 2 weken), verlaagde voedselinname of verminderde verzorging zal het dier meteen worden geëuthanaseerd (=humane eindpunt) waardoor ernstig ongerief wordt voorkomen.

**Uitkomst parameters:** [redacted] (bepaald door [redacted] testen), [redacted] [redacted].

#### **Referenties**

1. [redacted]

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.

De dieren worden [redacted], of saline ter controle. De farmacologische behandeling door het toedienen (oraal, sc of ip) van farmaca als onderdeel van de multimodale therapie hangt van de factoren die komen uit het onderzoek beschreven in bijlagen 1-3 of

ander onderzoek.

De dosis en de frequentie hangen en de toedieningsroute is afhankelijk van het farmacon (geselecteerd uit bijlage 2 of de literatuur) met een wekelijkse behandeling met een duur van 2 – 5 maanden. Dit zal per werkprotocol met de IvD worden afgestemd.

**Tabel 1: overzicht handelingen**

A. handeling	B: Frequentie	C. duur
█ injectie	eenmalig	10 min.
Farmacologische behandeling, p.o. s.c of i.p.	1 x dag of 1 x week	Max 5 mnd
█	Max 3 maal	Max 5 min per test
█	Max 3 maal	Max 5 min per test
█	Max 4 maal	Max 5 min per test
Doden	1 maal	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4mnd		2-6 maanden

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

Door de multidisciplinaire aanpak van dit project kan met een minimale fok (en dus zo min mogelijk surplus dieren) het onderzoek worden uitgevoerd. Op basis van de experimenten beschreven in bijlagen 1 – 3 kan een goede keuze worden gemaakt voor het optimale model en de optimale keuze van farmaca.

Hoofd parameter is de histopathologie om aan te tonen dat de █ zich heeft hersteld.

Verwachte uitkomst: Wij verwachten dat de █ een verminderd fenotype geven van onze █ muis, aangezien █

Gebruik per jaar per lijn

**Testen van farmaca:**

█ BL6 muizen:

- ⇒ █ worden gebruikt omdat zij tijdens het leven geleidelijk aan een █ gaan vertonen en zo de mogelijkheid geven om het effect van de behandeling te volgen.
- ⇒ Behandelde dieren worden op 3 leeftijden bestudeerd: █ (pre-klinisch symptomatisch); █ (klinisch symptomatisch); █ (evident klinisch symptomatisch). Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- ⇒ 2 behandelgroepen: vehicle + compound, deze compounds zijn geselecteerd uit eerder onderzoek of nieuwe resultaten uit bijlage 1-3. De compound zal als zuivere stof in een farmacologisch vehicle worden toegediend.
- ⇒ Het te isoleren materiaal voor verdere analyse dient verschillend verzameld te zijn: vers en na perfusie (onder anesthesie)
- ⇒ Berekening van aantal dieren:  
Gebaseerd op eerdere studies is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:  
█
- ⇒ 7 dieren per groep
- ⇒ Aantal dieren: 3 leeftijden x 2 behandelgroepen x 2 weefselgroepen x 7 dieren/groep= 84 dieren per experiment
- ⇒ Ivm met opvolgen van dieren achten we dat max 2 compounds per jaar getest kunnen worden:  $84 \times 2 = 168$  dieren
- ⇒ Aantal interventies: 2 interventies per jaar en maximaal 10 interventies per 5 jaar.

**Testen van █ in combinatie met █:**

#### **BL6:**

- ⇒ Behandelde dieren worden met de volgende therapievormen behandeld: 1) / ( 2) genconstructen
- ⇒
- ⇒ Berekening van aantal dieren:  
Gebaseerd op eerdere studies ( ) waarbij ook is gekeken naar verbeterd van muizen met een na behandeling met
- ⇒ 20 dieren per groep, maar omdat dat in de praktijk niet haalbaar is worden experimenten om praktische redenen sequentieel uitgevoerd op basis van nesten.
- ⇒ Aantal dieren: 3 leeftijden ( ) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 dieren per groep = 120 dieren
- ⇒ Om logistieke redenen worden er niet meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd. Maximaal aantal pups dat er per maand geïnjecteerd wordt: 8 (nestjes per maand) \* 6 (± dieren per nestje) = 48 dieren
- ⇒ Voor iedere conditie (binnen 1 experiment) wordt 1 nestje gebruikt; het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. De resterende dieren worden verzameld voor biobanking.
- ⇒ Per jaar wordt er maximaal getest: 48 (dieren per maand) \* 12 (maanden per jaar) = 576 pups
- ⇒ Berekening van aantal interventies per jaar: 576 pups / 120 (dieren per experiment) = 4,8
- ⇒ Aantal interventies: 4-5 interventies per jaar en 20-25 interventies per 5 jaar.

#### **Genereren van celpopulaties:**

##### Genereren van muis donorcellen:

###### C57BL/6J muizen:

- ⇒ De gezonde muis voorlopercellen worden uit E18 C57BL/6J pups geïsoleerd. Voor de isolatie van voorlopercellen worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.
- ⇒ Onze experimenten hebben aangetoond dat we uit een
- ⇒ Aantal dieren: 576 (pups per jaar) / 12 (dieren per injectie) \* 1/3 (injecties met muiszellen) \* 12 (pups) = 192 E18 pups per jaar.

##### Genereren van humane donorcellen:

###### RAG2null BL6 muizen:

- ⇒
- ⇒ De parameters (cel analyses) worden op twee leeftijden: ) geanalyseerd;
- ⇒ Voor iedere leeftijd injecteren we 3 dieren. Ondanks dat 1 succesvol geïnjecteerd dier volstaat, houden we rekening met experimentele variatie:
- ⇒ Iedere goed-geteste is genoeg voor de injectie van 30 dieren.
- ⇒ Per jaar worden maximaal 576 dieren getransplanteerd; 2/3 vd experimenten worden met geïnjecteerd.  $576 * 2/3 / 30 = 12,8$  batchen per jaar

⇒ Aantallen: 12,8 batches \* 2 (leeftijden) \* 3 (dieren/leeftijd) = 76,8 (77) dieren per jaar

## B. De dieren

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

**Diersoort:** muis (*Mus musculus*) en genetisch gemodificeerde muizen.

**Herkomst:** alle dieren worden in het proefdiercentrum gefokt onder SPF condities.

De homozygote mutanten worden gegenereerd met de [REDACTED]

Er worden [REDACTED] gebaseerd op resultaten uit bijlagen 1 – 3), [REDACTED] en WT C57BL/6J muizen gebruikt. Wanneer humane progenitor cellen worden geïnjecteerd, zullen [REDACTED] muizen op een [REDACTED] achtergrond worden gebruikt omdat anders de getransplanteerde cellen worden afgestoten.

C57BL/6J muizen worden gebruikt om controle progenitor cellen te isoleren.

De behandeling van de [REDACTED] dieren zal vanaf P0 starten. Het precieze tijdstip van farmacologische behandeling hangt deels af van de factoren die uit het onderzoek beschreven in bijlages 1-3 komen.

Alle pups in het nestje worden gebruikt, aangezien op E18-P0 de sexe lastig is te bepalen.

### Aantallen en levensstadia

Aantallen en levensstadia per jaar:

Diersoort	Muis	Muis	Muis	Muis
Aantal	168	576	192 + 32 moeders	77
Stam	[REDACTED] BL6	[REDACTED] BL6	C57BL/6J	RAG2null BL6
Geslacht	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen
Leeftijden (maanden)	[REDACTED]	[REDACTED]	E18, 8 tot 20 weken voor moeders	2 m, 4 m

- Drachtige muizen waarvan de pups (beide sexen) op E18 onder terminale anesthesie en hysterectomie worden geboren.
- De genereerde nestjes worden geïnjecteerd met [REDACTED]
- Per experiment worden de muizen na [REDACTED] Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- Het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. Wanneer niet alle dieren nodig zijn, worden de resterende dieren verzameld voor biobanking.
- Experimentele variaties kunnen ontstaan doordat [REDACTED] ). Met deze variaties is al rekening gehouden in de bovenstaande berekeningen van aantallen.



- Om logistieke redenen is het niet realistisch dat er meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd worden.

Maximaal 1045 dieren

### 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:

Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair [redacted] gedaan aan [redacted] (van [redacted] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit [redacted] geen belangrijke [redacted]. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met [redacted] van patiënten [redacted]).

[redacted] de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

#### Vermindering:

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. [redacted]. De groeps grootte is statistisch bepaald.

#### Verfijning:

Er wordt op basis van de resultaten uit bijlage 1 – 3 een model gekozen met milde ziekte kenmerken. Weliswaar duren de experimenten dan langer voordat effecten kunnen worden waargenomen, maar wordt matig tot ernstig lijden voorkomen. Daar het verloop van de ziekte ons bekend is wordt tijdig voer op de bodem van de kooi gelegd en worden de experimenten beëindigd op het moment dat we effecten op coupe niveau (histopathologie) mogen verwachten. Door de multidisciplinaire aanpak beschreven in de 4 bijlagen kan een zeer efficiënte fok worden opgezet en worden grote aantallen surplus dieren van niet-gewenste genotypes voorkomen.

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.

[redacted] (zoals > 15% gewichtsverlies, [redacted]) zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er wordt samen met de IvD een score tabel opgesteld voor een humaan eindpunt waardoor ernstig ongerief voorkomen kan worden. De genetisch gemodificeerde dieren,

hun controles en het gebruikte beddingmateriaal wordt conform de wet verbrand zodat niets in het milieu terecht kan komen.

## 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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn

## 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.

De mannetjes worden solitair gehuisvest omdat bekend is dat deze vechten bij groepshuisvesting.

### 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.

Het moederdier zal onder terminale anesthesie een hysterectomie ondergaan.

Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk (Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (2008),

[redacted] Pups worden na de behandeling bij fostermoeders gelegd. Dat gaat heel goed.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

Uit de bestaande genetisch gemodificeerde muizen wordt een mild model gekozen en wordt er zacht voer op de bodem van de kooi gelegd. De uitgevoerde behandelingen (intracraniele toediening van cellen) gebeurt onder pijnbestrijding. Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk (Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (2008), editors: R.E. Fish, M.J. Brown, P.J. Denneman, A.Z. Karas), daarom wordt hypothermie gebruikt door de pups in met ijs gekoelde (klei vervaardigde) mallen te plaatsen. Direct contact met ijs wordt vermeden om bevriezing van de huid te voorkomen.

#### 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.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

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

10%

#### K. Classificatie van ongerief

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

. Er worden geen complicaties verwacht van farmaca doordat deze zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is dus niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken farmaca ongerief veroorzaken.

**Tabel 2: ongerief per handeling**

A. handeling	B. kwalificatie <i>terminaal/gering/matig/ernstig</i>	C. duur v.h. ongerief
Uithalen van baarmoeder	terminaal	2 min
	Matig (onder anesthesie)	10 min.
i.p. injecties	Matig	30 sec (dagelijks tot wekelijks)
	Licht	3x 5 min
	Licht	4x 5 min
Doden	Licht (onder anesthesie)	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4 maanden	Matig	2-6 maanden

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Nee > ( ) voor verdere ex-vivo analyse.

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

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

*Het NVWA nummer is 11400*

2. Titel van het project:

**[REDACTED]** *in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën*

3. Titel van de NTS:

**[REDACTED]** *in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën*

4. Type aanvraag:

*Nieuwe aanvraag projectvergunning*

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: **[REDACTED]**
- telefoonnummer contactpersoon: **[REDACTED]**
- e-mailadres contactpersoon: **[REDACTED]**

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

- ontvangen door DEC: *26-04-2017*
- aanvraag compleet: *26-04-2017*
- in vergadering besproken: *09-05-2017 en 13-06-2017*
- anderszins behandeld: *n.v.t*
- termijnonderbreking(en) van / tot: *09-05-2017 tot 06-06-2017 en 14-06-2017 tot 20-06-2017*
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: *20-06-2017*
- advies aan CCD: *17-07-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

-Datum advies IvD: *26-04-2017*

-Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*

8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*

9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *09-05-2017*

- Strekking gestelde vragen: *De aanvraag moet op een hoger aggregatieniveau worden beschreven, er staan momenteel teveel details in, die vaak niet aan de orde zijn voor het beantwoorden van de gestelde vraag. Het is niet duidelijk wat er nu precies met één dier gebeurt, beschrijf de beoogde handelingen (aard, frequentie, duur) en verklaar de gekozen aanpak. Het wetenschappelijk belang moet beter naar voren komen. Voor de DEC is de strategie en de procesflow*

*nog niet helder, punt 3.4. Graag ook Figuur 1 bij 3.4.3 aanpassen. De verschillende ingrepen bij de dieren weergeven in een tabel.*

- Datum antwoord: 06-06-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De aanvraag is aangepast op de bovenstaande punten.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De DEC was van mening dat de aanvraag op een volgende DEC vergadering moest terugkomen.*

### Vraagronde 2

- Datum: 14-06-2017
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC dat hier nog een stuk tekst over het waarom men gebruik wil gaan maken van ██████ wordt toegevoegd. Bij de bijlagen moet onderdeel A duidelijk korter, less is more. Bijlage 4: Voor de DEC is het idee van de ██████ nog niet helder, hoe ga je dit doen? En met welke ██████ En hoe ga je het resultaat meten?*
- Datum antwoord: 20-06-2017
- Strekking van de antwoord(en): *Onderzoek in muismodellen heeft laten zien ██████. Vervanging van de ██████ in patiënten met ██████ biedt dus therapeutische mogelijkheden. Door het gebruik van ██████ wordt ██████ beoogd (zie bijlage 4).*

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

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

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: n.v.t., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

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

1. *Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. *Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).: n.v.t.*

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.

### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Neurodegeneratieve ziekten zijn aandoeningen waarbij de hersenen en/of het zenuwstelsel zijn aangedaan. Een van de ernstigste ziekten op dit gebied bij kinderen is de erfelijke [REDACTED] waarbij de [REDACTED] deze ziekte wordt om die reden [REDACTED] ( [REDACTED] ) genoemd. Als in gezonde kinderen en volwassenen de [REDACTED] van de hersenen beschadigd wordt, wordt de schade door bepaalde cellen [REDACTED] ) gerepareerd; dit herstelmechanisme faalt bij kinderen met [REDACTED]. Hierdoor ontwikkelen deze kinderen o.a. motorische coördinatieproblemen, spasticiteit en epilepsie. Veel van deze kinderen sterven op jonge leeftijd. Er is nog geen behandeling voor [REDACTED] en het ziektemechanisme is nog onvoldoende duidelijk. Wel is duidelijk dat [REDACTED] bij [REDACTED] een grote rol spelen en dat alle [REDACTED] functies bij de ziekte aangedaan zijn.

Het directe doel van deze studie is het ontrafelen welke mechanismen bij [REDACTED] betrokken zijn, waarom koorts de ziekte zo snel verergert en hoe de beschadigde [REDACTED] hersteld kan worden. Wanneer er in kaart is gebracht welke [REDACTED] hierbij belangrijk zijn kan men onderzoeken welke [REDACTED] behandeld moet worden om de [REDACTED] afwijkingen bij [REDACTED] te beïnvloeden. Dit wordt in een proefdiermodel met [REDACTED] uitgezocht. Ook de invloed van een bepaald [REDACTED] wordt onderzocht.

Het uiteindelijke doel van de studie is om een [REDACTED] therapie (een [REDACTED] behandeling met [REDACTED] ) te ontwikkelen voor patiënten met [REDACTED] ), die de ziekte remt of zelfs geneest.

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten ( [REDACTED] ). De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan, symptomen [REDACTED] ) vertonen en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor [REDACTED] bevorderd worden: De fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie om [REDACTED] ) te remmen of te genezen. Hiernaast kan dit onderzoek ook informatie opleveren voor de behandeling van andere neurodegeneratieve ziekten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: n.v.t

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder, en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van een nieuwe therapie om ██████████ te remmen of zelfs te genezen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw en de financiële ondersteuning.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.*

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

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

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.*

*De dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. Daar waar een behandeling zal aanslaan, zal het ongerief licht zijn. Van alle dieren zal ongeveer 40% licht ongerief en 60% matig ongerief ondervinden. Licht ongerief ontstaat in dierproef 1 en 4 als gevolg van mobiliteitstesten en het doden van de dieren. Licht ongerief ontstaat in dierproef 2 als gevolg van mobiliteitstesten, het ██████████ bloedafnames, injecties, anesthesie en doden. Licht ongerief ontstaat in dierproef 3 door de*



*uitname van de hersenen onder anesthesie voor ex-vivo analyses. De moederdieren ondervinden licht ongerief als gevolg van doding. Matig ongerief zal ontstaan als gevolg van injecties (onder anesthesie) en door de symptomen van de ██████████ (licht tot matig, afhankelijk van de duur).*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren mobiliteitstesten ondergaan, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood. Daarnaast zullen de dieren de symptomen van de ██████████ ontwikkelen, wat leidt tot ██████████ ██████████ De ontwikkeling van de ██████████ is een noodzakelijk onderdeel van het diermodel dat nodig is voor de proeven.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een scorelijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt: som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies.*

*De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinnname of verminderde verzorging van de vacht. Het fenotype ██████████ is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Bij het samenstellen van het werkprotocol zal hier gedetailleerd over gecommuniceerd worden met de IvD. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap) en het gewicht wordt gemonitord. De kans dat de dieren een humaan eindpunt bereiken is 10% in dierproef 1 en 4, 20% in dierproef 2 en 1% in dierproef 3. Meer dan matig ongerief wordt voorkomen door het toepassen van de humane eindpunten.*

### **3V's**

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Er wordt eerst vooronderzoek gedaan in celkweek, er wordt hierbij zoveel mogelijk gebruikt gemaakt van weefsel van overleden patiënten. Echter om de ██████████ en de behandeling hiervan goed te kunnen onderzoeken is een intact lichaam nodig om het ██████████ te kunnen meten. Het onderzoek mag niet in kinderen gebeuren als nog te weinig bekend is of de behandeling zal werken en of die behandeling dan ook veilig is. Daarom worden muizen gebruikt als model.*

*De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De muis is het kleinste model waarin de ziekte kan worden nagebootst met dezelfde mutatie in het gen als in de patiënt. Daarnaast komen de ziektekenmerken in de muizen precies overeen met die in de patiënten.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Soms is het nodig eerst een pilot uit te voeren om de haalbaarheid of het beste model te toetsen. De huisvesting en de voeding van de muizen is gestandaardiseerd zodat weinig spreiding in de resultaten van het onderzoek wordt verwacht.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 7902 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

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

*Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.*

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. Het is bekend op welke leeftijd de dieren motorische problemen kunnen gaan vertonen. Ruim voor die tijd wordt het voer op de bodem van de kooi gelegd en worden lange tuiten op de drinkflessen gezet, zodat de dieren makkelijker kunnen eten en drinken. Meer dan matig ongerief wordt voorkomen door het toepassen van de humane eindpunten.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: *n.v.t.*

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

*In dierproef 1 en 4 zullen dieren van beide geslachten worden gebruikt. In dierproef 2 worden alleen mannelijke dieren gebruikt, omdat men hier de [REDACTED] gaat meten. Door verschillen in [REDACTED] is statistische analyse van deze experimenten niet haalbaar als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog brengen. Ook in onderdeel A2 van dierproef 3 worden om dezelfde reden alleen mannelijke dieren gebruikt, bij alle andere*

*onderdelen gebruikt men beide geslachten.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

*Na het doden van de dieren zal men de hersenen gebruiken voor verdere ex-vivo analyses. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

### **NTS**

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

*De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de mechanismen die bij ██████████) betrokken zijn en het ontwikkelen van een ██████████ therapie voor kinderen met deze ziekte het gebruik van maximaal 7902 muizen die daarvan licht tot matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden licht tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling over deze wittestofziekte (██████). De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een therapie om ██████████ bij kinderen te verminderen of te genezen. Daarnaast kan dit onderzoek ook informatie opleveren voor de behandeling van andere neurodegeneratieve ziekten.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 7902 muizen, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van meer kennis over ██████████ en de*

*behandeling hiervan is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het verkrijgen van meer kennis over de betrokken mechanismen bij de erfelijke ██████████. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een behandeltherapie is afgewogen tegen het, licht tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 7902 muizen, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Zowel het maatschappelijk als het wetenschappelijk belang is substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over ██████████ en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling hiervan.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 7902 muizen en het daarbij verwachte lichte tot maximaal matige ongerief.*

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Er is geen dilemma geconstateerd.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[redacted] 20172804  
**Bijlagen**  
2

Datum 1 augustus 2017  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 juli 2017. Het gaat om uw project "[redacted]": pathogenese en potentiële interventie therapieën". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020172804. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

#### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

#### **Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). 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

**Datum:**

1 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

20172804

**Datum:**  
1 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[REDACTED] 20172804

### Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]  
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: [REDACTED]  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED]  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



**Datum:**  
1 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[REDACTED] 20172804

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2018

Geplande einddatum: 1 januari 2023

Titel project: [REDACTED]: pathogenese en potentiële interventie therapieën

Titel niet-technische samenvatting: [REDACTED]: pathogenese en potentiële interventie therapieën

Naam DEC: [REDACTED]

Postadres DEC: [REDACTED]

E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.684,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

13 f functionaris ( Proefdierdeskundige)

Plaats:

[REDACTED]

Datum:

[REDACTED]

**Datum:**

1 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

[REDACTED] 20172804



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[redacted] 20172804  
**Bijlagen**  
2

Datum 1 augustus 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 augustus 2017

Vervaldatum: 31 augustus 2017

Factuurnummer: 172804

Ordernummer: inkoopnr. [redacted]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag [redacted] 20172804	€ 1.684,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 31 augustus 2017 15:22  
**Aan:** 'info@zbo-ccd.nl'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: [REDACTED] 20172804: aanvullende informatie

**Urgentie:** Hoog

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

Hierbij wil ik u laten weten dat we de vandaag de aangepaste documenten behorende bij [REDACTED] 20172804 hebben geüpload.

Het zijn 7 documenten: De antwoorden op de vragen, de aangepaste NTS en de 4 bijlagen dierproeven en het (oude) projectvoorstel.

Hoop u zo voldoende te hebben geïnformeerd, mochten er nog vragen zijn dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

---

**From:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Subject:** AVD1140020172804: aanvullende informatie  
**Date:** 23 August 2017 at 11:55:39 GMT+2  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Op 31 juli 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer [REDACTED] 20172804. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U geeft aan dat er meerdere mobiliteitstesten zullen worden uitgevoerd. In de verschillende bijlages worden voorbeelden van uit te voeren testen genoemd. Dit moet, in het kader van het bepalen van het ongerief dat de dieren ondergaan, echter ingekaderd worden. U wordt daarom verzocht alle mobiliteitstesten te benoemen en te beschrijven.

-In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.4 wordt geen gebruik gemaakt van anesthesie voor [REDACTED] in jonge pups. U geeft aan dat het gebruik van anesthesie in dit geval niet mogelijk is. De onderbouwing hiervoor ontbreekt echter. Aangezien het niet toepassen van verdoving alleen mag als dit onverenigbaar is met de proef en/of het toedienen van verdoving traumatischer is dan de dierproef zelf, is onderbouwing noodzakelijk voor de beoordeling. U wordt daarom verzocht dit beter te onderbouwen. U wordt daarnaast verzocht aan te geven of bovenstaande ook van toepassing is voor bijlage 3.4.4.3, omdat daar ook intracraniale injecties in pups worden uitgevoerd. Tot slot geeft u in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.4 onder 'K' aan de intracraniale injecties onder anesthesie wordt uitgevoerd. Dit lijkt gezien bovenstaande niet correct. U wordt verzocht dit aan te passen.

- Mannelijke dieren worden in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.4 individueel gehuisvest vanwege onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting. In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.3 worden ook mannelijke dieren gebruikt. In

die bijlagen wordt echter niet aangegeven dat dieren individueel gehuisvest worden. U wordt verzocht aan te geven of de dieren in deze bijlage ook individueel gehuisvest worden.

- Er zijn een aantal onduidelijkheden wat betreft het ongerief en het benodigd aantal dieren:
    - >In bijlage 3.4.4.1. is niet helder gemaakt hoeveel dieren matig vs licht vs terminaal ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor bijlage 3.4.4.4.
    - >Het is niet geheel duidelijk hoeveel dieren in bijlage 3.4.4.4 nodig zijn. In de tabel onder B) en in de tekst bij de statistische overwegingen staat aangegeven hoeveel dieren per jaar gebruikt worden. Bij elkaar opgeteld zijn dit 1045 dieren per jaar. Uiteindelijk wordt voor de gehele bijlage 1045 dieren aangevraagd. Indien het inderdaad 1045 dieren per jaar betreft, zijn 5225 dieren nodig.
- U wordt verzocht deze onduidelijkheden te verhelderen, de bijlagen dierproeven en eventueel ook de NTS aan te passen.
- U geeft aan dat in overleg met IvD een scorelijst wordt opgesteld voor de humane eindpunten. U wordt verzocht deze scorelijst ook in de aanvraag op te nemen.

### **Opsturen binnen veertien dagen**

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 24 augustus. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

### **Wanneer een beslissing**

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

### **Meer informatie**

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Info-zbo  
Verzonden: dinsdag 1 augustus 2017 11:28  
Aan: [REDACTED]  
CC: [REDACTED]  
Onderwerp: OntvangstBevestiging 2804

Geachte [REDACTED],

Deze brief ontvangt u ook per post.  
Factuur is doorgestuurd naar de door u aangegeven emailadres.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Geachte CCD,

Hierbij een antwoord op uw vragen bij ons project met aanvraagnummer AVD1140020172804.

- U geeft aan dat er meerdere mobiliteitstesten zullen worden uitgevoerd. In de verschillende bijlages worden voorbeelden van uit te voeren testen genoemd. Dit moet, in het kader van het bepalen van het ongerief dat de dieren ondergaan, echter ingekaderd worden. U wordt daarom verzocht alle mobiliteitstesten te benoemen en te beschrijven.

**Antwoord: Dit is in de bijlages aangepast.**

**Het gaat hier om standaard motorisch testen zoals *grip strength measure* (griepkrachtmeting), *balance beam* (balans balk), *foot print test* (voet afdruk test) zoals eerder door deze groep beschreven (Dooves et al., 2016). Deze testen worden gebruikt om de mobiliteits- en krachtveranderingen bij deze dieren te kunnen meten. Deze testen geven maximaal licht ongerief en hebben geen nadelige gevolgen voor de dieren.**

-In bijlages 3.4.4.1 en 3.4.4.4 wordt geen gebruik gemaakt van anesthesie voor [REDACTED]. U geeft aan dat het gebruik van anesthesie in dit geval niet mogelijk is. De onderbouwing hiervoor ontbreekt echter. Aangezien het niet toepassen van verdoving alleen mag als dit onverenigbaar is met de proef en/of het toedienen van verdoving traumatischer is dan de dierproef zelf, is onderbouwing noodzakelijk voor de beoordeling. U wordt daarom verzocht dit beter te onderbouwen. U wordt daarnaast verzocht aan te geven of bovenstaande ook van toepassing is voor bijlage 3.4.4.3, omdat daar ook intracraniale injecties in pups worden uitgevoerd. Tot slot geeft u in bijlages 3.4.4.1 en 3.4.4.4 onder 'K' aan de intracraniale injecties onder anesthesie wordt uitgevoerd. Dit lijkt gezien bovenstaande niet correct. U wordt verzocht dit aan te passen.

**Helaas is er verwarring ontstaan. Het gaat hier om het toepassen van [REDACTED] als geaccepteerde vervangend methode van [REDACTED]. Bij oudere dieren wordt anesthesie toegepast. Die is nu aangepast in bijlages 1, 3 en 4.**

- Mannelijke dieren worden in bijlages 3.4.4.2 en 3.4.4.4 individueel gehuisvest vanwege onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting. In bijlages 3.4.4.1 en 3.4.4.3 worden ook mannelijke dieren gebruikt. In die bijlages wordt echter niet aangegeven dat dieren individueel gehuisvest worden. U wordt verzocht aan te geven of de dieren in deze bijlage ook individueel gehuisvest worden.

**De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Indien nodig worden mannelijke muizen solitair gehuisvest om vechten te voorkomen. Dit is nu in alle bijlages 1-4 vermeld.**

- Er zijn een aantal onduidelijkheden wat betreft het ongerief en het benodigd aantal dieren:  
>In bijlage 3.4.4.1. is niet helder gemaakt hoeveel dieren matig vs licht vs terminaal ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor bijlage 3.4.4.4.  
>Het is niet geheel duidelijk hoeveel dieren in bijlage 3.4.4.4 nodig zijn. In de tabel onder B) en in de tekst bij de statistische overwegingen staat aangegeven hoeveel dieren per jaar gebruikt worden. Bij elkaar opgeteld zijn dit 1045 dieren per jaar. Uiteindelijk wordt voor de gehele bijlage 1045 dieren aangevraagd. Indien het inderdaad 1045 dieren per jaar betreft, zijn 5225 dieren nodig.  
U wordt verzocht deze onduidelijkheden te verhelderen, de bijlages dierproeven en eventueel ook de NTS aan te passen.

**Deze informatie is nu in beide bijlages en NTS aangepast. Het totale aantal dieren is 12082 muizen.**

- U geeft aan dat in overleg met IvD een scorelijst wordt opgesteld voor de humane eindpunten. U wordt verzocht deze scorelijst ook in de aanvraag op te nemen.

**HEP is als volgt gedefinieerd: 15% gewichtsverlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies. Is toegevoegd aan alle bijlages. Bij het aanpassen van de bijlages op de bovenstaande punten hebben we nog enkele tekstuele fouten verbeterd.**



## Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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.  : pathogenese en potentiële interventie therapieën

### 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.

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



Deze projectaanvraag beschrijft het onderzoek naar [redacted] ) van kinderen. [redacted] veroorzaken een [redacted]. Deze aanvraag betreft een specifieke [redacted] is één van de vaakst voorkomende leukodystrofieën bij kinderen en één van de ergste. Bij [redacted] wordt al op zeer jonge leeftijd de [redacted] in de hersenen aangetast met neurologische achteruitgang tot gevolg. Patiënten overlijden vaak snel door verlies van functies. Het is een stress-gevoelige ziekte, waarbij fysieke stressoren, vooral koortsende ziekten, leiden tot snelle achteruitgang. In 2001 is vastgesteld dat [redacted] door mutaties [redacted] wordt veroorzaakt<sup>1</sup>. Deze [redacted].

Sinds 2001 onderzoeken wij de **pathofysiologie** van deze fatale ziekte, vooral ook om aangrijpingspunten voor therapie te vinden.

[redacted] spelen een essentiële rol in de homeostase van de hersenen. In de [redacted] controleren ze [redacted]. De interactie tussen [redacted] en [redacted] is belangrijk voor de [redacted] in de hersenen en voor de integriteit van de [redacted] reageren op [redacted] door middel van een complex proces, zogenaamde [redacted], wat een [redacted] met gunstige en ongunstige aspecten. [redacted] variëren van [redacted] en [redacted] tot [redacted] en [redacted]. Het is aangetoond dat zonder [redacted] groter wordt en [redacted] mislukt.

[redacted] **pathologie** varieert in ernst onder patiënten: van babyleeftijd met overlijden binnen een paar maanden tot kinderleeftijd met overlijden binnen enkele jaren tot in zeldzame gevallen volwassenleeftijd met langer overleven. [redacted] pathologie varieert ook in ernst [redacted] van de hersenen. Niet alleen is er [redacted] in ernst van wittestofschade, maar ook in kans op [redacted].

*Als we begrijpen waarom [redacted] het zoveel beter doen, kunnen we dit misschien in therapie vertalen.*

*We hebben aanwijzingen op een stoornis in de [redacted]. Dat de gestoorde [redacted] bijdraagt aan de [redacted] fpathologie in [redacted] is zeker; hoe moet nog worden onderzocht.*

Voor verder onderzoek hebben wij **2 muismodellen** ontwikkeld met dezelfde mutaties als in de mens voorkomen. Deze muizen vertonen dezelfde klinische kenmerken en wittestofafwijkingen als patiënten en kunnen daarom gebruikt worden voor verder onderzoek<sup>3</sup>. Met deze muizen zijn recent

sterke aanwijzingen gevonden dat bij [REDACTED] [REDACTED] zijn aangetast<sup>3</sup>.

Onderzoek naar het **moleculaire mechanisme** van [REDACTED] heeft aangetoond dat door de mutaties de activiteit van [REDACTED] is. [REDACTED] is essentieel voor de vertaling van mRNA naar eiwit en voor de regulatie van de snelheid van mRNA vertaling en daarmee de eiwitsynthesesnelheid. Met name is [REDACTED] belangrijk voor het remmen van de [REDACTED] bij stress, zoals [REDACTED]. Deze reactie heet de [REDACTED] (de [REDACTED]). De verlaagde activiteit van [REDACTED] in [REDACTED] leidt tot een chronische abnormale activatie van de [REDACTED] met verhoogd expressie van verschillende [REDACTED]. Als gevolg hiervan treedt een verandering van het [REDACTED] profiel op.

Wij hebben onderzocht wat het afwijkende [REDACTED] profiel is in de hersenen van patiënten en muizen (ongepubliceerde data). [REDACTED] geïdentificeerd, die verhoogd of verlaagd tot [REDACTED] komen in [REDACTED] vergeleken met wildtype controle muizen. De screen is bevestigd [REDACTED] [REDACTED] een afwijkende [REDACTED] vertonen. Immunohistochemische analyses op postmortem hersenmateriaal hebben aangetoond dat [REDACTED] en [REDACTED] bij patiënten dezelfde afwijkende [REDACTED] vertonen als de [REDACTED] muizen. We hebben gevonden dat de eerder gevonden afwijkende [REDACTED] wordt door [REDACTED] -

Hoe de regulatie precies verloopt, is nog onvoldoende bekend. Wij hebben in hersenen van [REDACTED] patiënten en [REDACTED] muizen bevestigd dat de [REDACTED] [REDACTED], geactiveerd zijn in [REDACTED] en [REDACTED]. Een link tussen eIF2B mutaties en gestoorde rijping van [REDACTED] en [REDACTED] in [REDACTED] is nog onvoldoende onderzocht. *Onduidelijk is of de [REDACTED] een (onvoldoende) beschermende of causale rol in het [REDACTED] ziektemechanisme heeft.* Door de [REDACTED] of de daardoor [REDACTED] (ook aangeduid als routes) te moduleren kunnen we deze vraag beantwoorden. Deze modulaties kunnen [REDACTED] bewerkstelligd worden in de [REDACTED] muismodellen. Om exact te begrijpen hoe de [REDACTED] het best kan worden gemoduleerd om de ziekte [REDACTED] te beïnvloeden, wordt het onderzoek op verschillende niveaus uitgevoerd en worden resultaten onderling vergeleken. De resultaten zullen leiden tot inzicht in hoe remming of verbetering van de ziekte bij [REDACTED] patiënten kan worden bereikt.

Er is geen **behandeling** voor [REDACTED] en het ziektemechanisme is onvoldoende duidelijk om verder te komen. Wel is duidelijk dat [REDACTED] een grote rol spelen en dat alle [REDACTED] functies aangedaan zijn. Daarom focussen we de laatste jaren op ontrafelen van de bijdrage van [REDACTED] aan ontstaan en progressie van de ziekte *in alle opzichten*. Voor [REDACTED] is het noodzakelijk dat *alle* functies van [REDACTED] hersteld worden. Het aanpakken van verschillende [REDACTED] dysfuncties vereisen verschillende therapieën en *een succesvolle therapie zal derhalve [REDACTED] zijn*, net als bij andere [REDACTED]. Vanwege de ernst van de ziekte en het overwegend voorkomen op de jonge kinderleeftijd en ontbreken van overlevingskansen is het cruciaal om onderzoek naar multimodale therapie nu uit te voeren. Onderzoek aan het ziektemechanisme en potentiële behandelstrategieën voor [REDACTED] vormen het doel van het beschreven werk, in vervolg op bovenbeschreven eerder gevonden resultaten. Dit onderzoek is uitgesplitst in verschillende deelonderzoeken, die elk met elkaar samenhangen en waar resultaten voortdurend worden vergeleken met resultaten uit patiëntmateriaal. Op basis van die gegevens wordt het plan bijgesteld. Dit wordt duidelijk gemaakt in de flowchart, besproken bij 3.4.3.

Het gehele onderzoek wordt vanuit de volgende 4 disciplines uitgevoerd in muismodellen: (1) in vivo, (2) ex vivo moleculair biologisch, (3) biochemisch, en (4) histopathologisch zonder en met interventies. Op deze manier kunnen snel gegevens binnen een multidisciplinair team worden verkregen en vergeleken met het huidige of nieuw patiëntmateriaal. De interventies bestaan uit het toedienen van [REDACTED]. Deze interventies worden hierna verder

uitgelegd. Voor deze multidisciplinaire aanpak is een grote subsidie aangevraagd, waarin al deze aspecten zijn benoemd. Einddoel is het ontwikkelen van multimodale therapie voor ██████ gebaseerd op de verworven kennis.

**Referenties:**



**3.2 Doel**

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

**Het hoofddoel is te komen tot een ██████ voor patiënten met ██████**

Daarvoor gaan we ons de komende jaren richten op onderzoek van de pathologie, inclusief de impact van specifieke interventies, en de achterliggende mechanismen van de ██████. Hiervoor zullen we materiaal gebruiken zowel geïsoleerd uit hersenen van overleden patiënten als uit muismodellen (normaal en ██████ waarin de ziekte is gemoduleerd. Het doel is alle mogelijke aangrijpingspunten voor therapie van ██████ te exploreren en op grond van de resultaten te komen tot ██████ therapie voor patiënten.

Deze projectaanvraag is onderverdeeld in vier sub-vragen, die onderling verband houden met elkaar en bij 3.4 verder worden uitgelegd en onderbouwd.

**Bijlage 1: Behandeling van ██████ in muizen met ██████ gericht op o.a verbeterde ██████ functie.**

M.a.w. vormen ██████ het enige celtype of zijn er nog andere celtypen waarop gentherapie gericht moet worden om verbetering te bereiken?

**Bijlage 2: Behandeling van ██████ in muizen door modulatie van ██████ moleculaire routes**

M.a.w. zijn verminderde ██████ activiteit en ██████ als enige routes verantwoordelijk voor het ██████ van de ██████?

**Bijlage 3: Verbetering van ██████ functie ex-vivo na isolatie van ██████ uit muizen met ██████**

M.a.w. welke (slechte) functies van ██████ moeten geremd worden en welke (goede) functies moeten worden versterkt ten gunste van ██████

**Bijlage 4: behandeling van ██████ in muizen met ██████**

M.a.w. kan ██████ de beschadigde ██████ bij ██████ herstellen en is het resultaat beter met ██████ therapie die geoptimaliseerd is in bijlage 1 - 3?

Daar alle onderzoeksvragen uit bijlagen 1 – 4 grotendeels parallel zullen worden uitgevoerd, waarbij tussentijds strategische besprekingen zullen zijn om go no-go's per bijlage te bespreken (keuze vervolgstap/diermodel/interventie) is een traject van 5 jaar haalbaar om naar een eerste aanzet voor een ██████ aanpak van ██████ te komen. Er is funding om het onderzoek te kunnen uitvoeren. De onderzoekers hebben jarenlange ervaring op dit gebied. Er is veel samenwerking tussen de

onderzoekers en de kliniek. De technische expertise om de experimenten (zowel in vivo als ex-vivo) is al aanwezig.

Gezien het voorwerk, de preliminaire data, het aantal mensen in de onderzoeksgroep en de expertise van de onderzoeksgroep met toonaangevende publicaties is het project zeer haalbaar. Het onderzoek hangt niet van het succes van 1 specifiek experiment af.

### 3.3 Belang

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

██████████ is één van de vaakst voorkomende en één van de ernstigste genetische ziekten van de ██████████ van de hersenen (zogenaamde "██████████" bij kinderen. ██████████ komen bij tenminste 1:7,500 kinderen voor, waarschijnlijk vaker. ██████████ is klinisch gekarakteriseerd door progressieve motorische problemen en verlies van ook andere neurologische functies door progressief verdwijnen van de ██████████. De beginleeftijd en ernst van ██████████ varieert en is afhankelijk van het de precieze mutatie (genotype). De ernstigste vorm van ██████████ ontstaat al intra-uterien; de pasgeborenen hebben een ernstige ██████████; zij sterven binnen enkele maanden. Bij de meeste kinderen met ██████████ ontstaat de ziekte tussen 1 en 6 jaar en volgt overlijden na enkele jaren. Latere vormen van ██████████ met ontstaan na de 6 jaar zijn veel zeldzamer; dan verloopt de ziekte langzamer en leidt de ziekte tot een langzaam progressieve encefalopathie en sterven na enkele tot enkele tientallen jaren. Voor ██████████ is geen behandeling beschikbaar. Het is daarom belangrijk de pathogenese van deze ziekte beter te begrijpen om daarmee aangrijpingspunten voor interventie strategieën te vinden. Hopelijk geven de gegevens die verkregen worden uit het hier beschreven onderzoek aanwijzingen voor behandeling van deze ziekte, zodat ernstige invaliditeit en (vaak zeer) vroege mortaliteit voorkomen kan worden.

#### Wetenschappelijk belang

Wetenschappelijk is het belangrijk dat het ziektemechanisme wordt opgehelderd (de rol van ██████████) en gepubliceerd, zodat deze informatie voor alle relevante wetenschappers beschikbaar is. De aanpak die wij voor ogen hebben kan mogelijk ook informatie opleveren voor onderzoekers die aan andere ██████████.

#### Maatschappelijk belang

Maatschappelijk is het belangrijk dat op basis van de wetenschappelijke gegevens onderzoek kan worden uitgevoerd naar de preventie en behandeling van deze ernstige ziekte, die veel leed en ook zeer hoge kosten met zich meebrengt. Daar het lijden van de patiënt ernstig en uitzichtloos is en het vaak (zeer) jonge kinderen betreft, is het leed voor de familie zeer groot. Momenteel is er geen therapie, alleen ondersteunende behandeling om het lijden te verlichten. Om een snelle voortgang van het onderzoek te garanderen is het belangrijk dat de voorbereidende stappen beschreven in de verschillende addenda apart van elkaar maar parallel kunnen worden uitgevoerd.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het primaire doel is een begin te maken van het ontwikkelen van ██████████ therapie voor ██████████. Hiervoor is een verdere opheldering van het ziektemechanisme onderliggend aan ██████████ en inzicht in het ██████████ noodzakelijk. Het onderzoek zal deels met patiëntmateriaal worden uitgevoerd en deels met materiaal uit genetisch gemodificeerde muizen, die dezelfde klinische verschijnselen en moleculaire en histopathologische afwijkingen vertonen als ██████████ patiënten, met wild-type dieren als controle.

Het onderzoek is verdeeld in de volgende research onderdelen:

## 1. █ therapie

Gebaseerd op literatuur gegevens dat gentherapie bij andere █ verbetering laten zien in de patiënt en de █ veilig worden geacht voor de patiënt; op welk celtype deze therapie bij █ gericht moet worden staat nog niet vast (alleen █?).

## 2. █ therapie

- zoals met █ beïnvloeden;
- om het █ te maken.

3. █ therapie om zieke █ en █ te vervangen en weefselschade te herstellen.

## 4. De combinatie van 1.-3. Is de basis van de █ therapie:

Er zijn toenemende aanwijzingen dat █ aanpak bij █ beter effect heeft<sup>6</sup>. Sinds 2009 werken wij aan de ontwikkeling van █ en █ therapie. Daarbij kunnen nieuwe inzichten in het ziektemechanisme leiden tot nieuwe therapie strategieën.

█ was tot nog toe een onbehandelbare ziekte, waar de uitkomst van vaststond: toenemende handicap en overlijden. Met meer inzicht komt therapie voor █ dichterbij. Uit onderzoek aan andere █ blijkt dat een combinatie therapie het meest succesvol is<sup>6</sup>. Wij beogen derhalve de ontwikkeling van een █ therapie waarbij █ op verschillende █ wordt aangepakt: de activiteit van █ of daaraan gerelateerde █ routes, de █ in het DNA, de █.

De beste benadering voor █ lijkt dat de patiënt eerst wordt voorbereid met farmaca waarvan bekend is dat zij deels verbetering geven op verschillende niveaus, zoals verhoging van de █ activiteit in █ en verlaging van de █. Met █ kunnen cellen waar de █ op gericht is, genezen worden. Met █ wordt herstel van de █ beoogd. Als de █ omlaag gebracht is, kunnen █ (zie b) en als gevolg daarvan de █ de beste kans van slagen. We voorzien derhalve dat een effectieve en veilige behandeling bestaat uit █ nodig zal zijn voor de behandeling █ Met dit project hopen we dat we voldoende gegevens verkrijgen om een antwoord op de therapievraag te geven.

---

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

De gegevens die wij tot nu toe hebben verkregen uit zowel patiënt als muis zijn de basis voor het huidige onderzoek.

De muismodellen die wij hebben ontwikkeld geven een representatief beeld van de menselijke ziekte █. De twee █ modellen (█, █) hebben mutaties waarvan bekend is dat beide mutaties bij █ patiënten onafhankelijk van elkaar een ernstig ziektebeeld veroorzaken. In de twee muismodellen zijn vergelijkbare klinische en histopathologische verschijnselen waargenomen als wij bij patiënten hebben gezien:

- heterozygote-homozygote █ (█) muizen;
- en de dubbel homozygote (█) muis.

Hiervan is de █ het mildste model, en de █ het ernstigste model.

**Bijlage 1 █ therapie:** beschrijft de onderzoeksvraag of █ een █ ziekte is en de ziekte alleen gedreven wordt door de █. Het moet duidelijk worden of er een 'by-pass' mechanisme is waardoor █. Dit is met name een celbiologische aanpak.

**Bijlage 2** [redacted] **therapie (in vivo):** beschrijft de [redacted] routes van [redacted] en richt zich op de rol van [redacted]. Welke afwijkende [redacted] speelt daarbij een rol en kan het moduleren van [redacted] het ziekteproces beïnvloeden? De nieuwe muismodellen (o.a. door kruisingen van de [redacted] met specifieke knockout muizen stammen) worden gedegen in kaart gebracht. Daarnaast zullen [redacted] toegepast worden, die specifiek aangrijpen op een onderdeel van [redacted] waarna het effect in het model bestudeerd kan worden. Hier vinden interventies ('behandelingen') plaats, en worden naast de ex-vivo analyse van moleculair-biologische en histologische parameters ook klinische relevante parameters beoordeeld op het gebied van motoriek [redacted].

**Bijlage 3** [redacted] **therapie (ex vivo):** beschrijft met *ex-vivo* materiaal (mens en muis) m.b.v. cel- en weefselkweek en eiwit analyses hoe de [redacted] en het noodzakelijke herstel daarvan bepalen. We willen duidelijk krijgen waarom en hoe het herstelmechanisme van de [redacted] faalt.

**Bijlage 4** [redacted]: beschrijft het effect met [redacted] op [redacted] muizen, geïsoleerd gevolgd door verschillende [redacted] routes met stoffen, die uit eerder onderzoek of uit resultaten van bijlage 1 – 3 geselecteerd zijn. Hier wordt dus de optimale [redacted] therapie gezocht.

---

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.

---

Het onderzoek naar de pathogenese en het onderzoek naar de mogelijke behandeling van patiënten met [redacted] hangen nauw met elkaar samen. De behandeling streeft er immers naar om op cel niveau het falen van de [redacted] in verschillende taken te kunnen herstellen. Er is daarom bewust gekozen om enerzijds door moleculair-biologisch en eiwit onderzoek de betrokken route(s) te onderzoeken en door cellulair-pathologisch onderzoek het cellulaire mechanisme te doorgronden en anderzijds daar waar meer inzicht verkregen wordt in een moleculair of cellulair mechanisme dat te repareren door [redacted].

Deze benadering is bewust verdeeld in de expertises van betrokken onderzoekers (pathologisch / celbiologisch, moleculair biologisch en stam celbiologisch). Het gehele onderzoek valt onder de supervisie van de hoogleraar die [redacted] ook het patiënten onderzoek leidt. In deze multidisciplinaire groep van onderzoekers worden de resultaten gezamenlijk besproken en worden vervolgstappen in het onderzoek vastgesteld. Per bijlage worden deze specifieke mijlpalen en keuzemomenten besproken, zodat per bijlage 1 – 3 alleen de optimale interventie uiteindelijk in [redacted] in bijlage 4 zal worden onderzocht. .

Het onderzoek wordt breed opgezet door parallel histopathologisch, moleculair biologisch, celbiologisch en preklinisch (in muizen modellen) onderzoek te verrichten en de gegevens continue met elkaar te vergelijken. Indien in een van de onderzoekslijnen (lees dierproef beschreven in de bijlagen) resultaat gevonden wordt, wordt dit direct besproken met alle onderzoekers en wordt indien nodig het onderzoek aangepast. Daar waar gegevens leiden tot een 'dood spoor', wordt het gerelateerde onderzoek in de andere onderzoekslijn stopgezet.

Eén en ander moet duidelijk worden uit de flowchart bij 3.4.3. met de 'go-no go momenten' erin opgenomen welke per bijlage staan vermeld.

---



**Figuur 1: Flowchart voor [redacted] via afzonderlijke benaderingen.**

De flowchart brengt de strategie in beeld om met gegevens vanuit de patiëntjes, welke input geven om de ziekte eerst via aparte benaderingen (cellulair, moleculair biologisch en genetisch) specifiek te onderzoeken. De onderzoeksstrategieën in bijlages 1,2,3 en 4 zullen simultaan starten. Binnen iedere bijlage zijn er GO en NO-GO stappen. Daarnaast zullen onderzoeksresultaten binnen iedere bijlage geprojecteerd worden op de andere bijlages (blauwe pijlen). Alle verkregen resultaten zullen convergeren in bijlage 4. Alleen die benaderingen welke verbetering geven, zullen doorgaan voor het onderzoek met [redacted]. Hiermee willen vinden welke aangrijpingspunten helpen om de ziekte [redacted] te verbeteren. Met een [redacted] moeten de afzonderlijke benaderingen elkaar versterken en hopen we uiteindelijk de ziekte tot stilstand te kunnen brengen of te genezen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] <b>therapie</b> gericht op o.a verbeterde astrocytaire functie.
2	Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] <b>interventie</b>
3	Verbetering van [redacted] functie door <b>celbiologisch interventie</b> : ex-vivo analyses na isolatie van o.a [redacted].
4	Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] <b>therapie</b> van [redacted].
5	
6	
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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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          | Behandeling van <input type="text"/> in muizen met <input type="text"/> gericht op o.a verbeterde <input type="text"/> functie. |
- 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.

De huidige gegevens wijzen erop dat  een  ziekte is. Een alternatieve hypothese is dat  wordt veroorzaakt door een simultaan effect door een mutatie . Deze vraag of  een  ziekte is kan worden beantwoord door onderzoek (ex-vivo) op de hersenen van verschillende mutante muizen stammen.

**1. Door kruising van conditionele  muizen aan  lijnen, wordt onderzocht of selectieve expressie van mutant  is om  ziekte te veroorzaken**

Een nieuwe  knock-in muizenstam, waarbij de mutatie door kruising selectief in verschillende celtypes tot expressie gebracht kan worden, wordt momenteel met  techniek elders gemaakt. De specifieke rol van  zal onderzocht worden door de conditionele -in te kruisen met muizenstammen die  in  tot expressie brengen.

**2. Met behulp van *in vivo* lentivirale transductie, wordt onderzocht of genetische correctie in een specifieke neurale celpopulatie de ziekte voorkomen kan worden.**

Gebruikmakend van de beschikbare  muizen modellen (als eerste keus het  mutante model [verder te noemen ] met mild ongerief) zullen wij het genetische defect selectief corrigeren door . Deze benadering is gebaseerd op het feit dat in recessieve ziekten zoals  de introductie van één normale kopie van het gemuteerde gen al voldoende is de ziekte te genezen omdat heterozygote carriers geen ziektebeeld hebben. Om de resultaten van deze gen-correctie te bestuderen zullen we  gebruiken die het wild type  gen tot expressie brengen van een promotor waarvan bekend is dat tot expressie komt in  celtypes. We verwachten dat correctie



in [redacted] het beste herstel geeft. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat ook andere kruisingen [redacted] mutatie in specifieke celpopulatie) een phenotype geven, wordt er gekozen voor gencorrectie in [redacted] en in alle [redacted]. De [redacted] zullen een [redacted] label reporter [redacted] - [redacted]. Dit zal het monitoren van de transductie efficiëntie en de *in-vivo* aanwezigheid en expressie faciliteren. [redacted] vectoren met alleen het [redacted] reporter gen zullen als controle worden gebruikt. Deze gencorrectie zal direct na de geboorte en lang voor de start van de pathologie worden uitgevoerd in [redacted] muizen.

In alle muizen zal het volgende worden onderzocht:

- a. klinisch fenotype ([redacted]);
- b. ex-vivo [redacted];
- c. ex-vivo [redacted]

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.

**A.** Intracraniale (i.c.) injectie met [redacted] op dag 0: pups worden na spontane partus van het moederdier gebruikt.

Er is gekozen voor i.c. injectie op P0-1 omdat de behandeling vroeg in de ontwikkeling gedaan moet worden en op deze leeftijd de toediening snel uitgevoerd kan worden. [redacted]

**Tabel 1: overzicht handelingen**

A. Soort ongerief	B. Frequentie	C. Duur v.h. ongerief
Intracraniale injectie	eenmalig	10 min.
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
Doden	1 maal	1 min
[redacted] fenotype		2-7 maanden

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

Het volgende go-no-go schema wordt aangehouden:

Vraag	Stap		Aantal dieren	go / no go
1	a	In vivo analyse van [redacted] in specifieke [redacted] celtypes op ~5 maanden	max. 30	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende glia maturatie in brein: go naar Stap b
	b	In vivo analyse van [redacted] mutatie in specifieke [redacted] celtypes op ~2 maanden en max. 12 maanden leeftijd	max. 130	

2	a	In vivo analyse van [redacted] in specifieke [redacted] celtypes op ~5 maanden leeftijd	max. 144	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende glia maturatie in brein: go naar Stap b
	b	In vivo analyse [redacted] gencorrectie in specifieke [redacted] celtypes op ~2 maanden en max. 12 maanden leeftijd	max. 288	

### Vraag 1:

#### Stap a:

- [redacted] muizen worden gekruist aan 4 cre-lijnen (cre-expressie in alle [redacted] [redacted], [redacted] specifieke cellen), of als controle niet gekruist. Alle dieren worden in eerste instantie op 1 leeftijd geanalyseerd: ~5 maanden (de leeftijd van vroege klinische symptomen).
- Analyses worden uitgevoerd op vers (snap-frozen) en gefixeerd (4% PFA intracraniale perfusies) weefsel
- Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:  
Controle (saline): gemiddelde gevonden waarde 0.86 (aantal nestin-positieve cellen)  
Gewenst effect na behandeling:  $\leq 6.32$ ; st.dev.: 2.2 en desired power: 0.8  
 $\Rightarrow >3$  dieren per groep  
Aantal dieren: 5 lijnen (4 kruisingen + 1 controle) x 1 leeftijd (~5 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 30 dieren
- Alleen de dieren die een fenotype vertonen worden gebruikt in verdere analyses ('go'); andere dieren worden uit de studie gehaald ('no-go').

#### Stap b:

- Wanneer de dieren in Stap 1 een fenotype vertonen, zullen deze kruisingen ook in Stap 2 worden geanalyseerd: meer verschillende leeftijden.
- Conditionele [redacted] mutanten worden geanalyseerd op ~2 maanden (pre-symptomatisch), ~5 maanden (vroege klinische symptomen; in Stap 1), tot aan het humaan eindpunt (~ 7-12 maanden, sterke klinische symptomen) of eerder als er significante verbetering is gezien in de behandelde groep(en).
- Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:  
Control (saline): gemiddelde gevonden waarde 2.08 (grip strength test), gewenst effect na behandeling:  $\leq 1.87$ , St. dev.: 0.16 en desired power: 0.8  
 $\Rightarrow >10$  dieren per groep  
Aantal dieren voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 2 (1 kruising = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 40 dieren
- Om de ~2 maanden dieren te verzamelen. Gebaseerd op een eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd: Controle (saline): gemiddelde gevonden waarde 0.86 (aantal nestin-positieve cellen)  
Gewenst effect na behandeling:  $\leq 6.32$ ; St. dev.: 2.2 en desired power: 0.8  
 $\Rightarrow 3$  dieren per groep  
Aantal dieren voor pre-symptomatisch analyse: 2 (1 kruising + 1 controle) x 1 leeftijden (~2 maand) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 12 dieren
- Zullen er meer leeftijden van verschillende kruisingen worden geanalyseerd, hoeft er geen nieuwe controle groep worden meegenomen. Dus voor 4 kruisingen voor pre-symptomatisch analyse: 5 (4 kruisingen + 1 controle) x 1 leeftijden (~2 maand) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 30 dieren. En voor 4 kruisingen voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 5 (4 kruisingen = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 100 dieren
- Maximaal aantal muizen: 52 - 130

### Vraag 2:

#### Stap a:

[redacted] met [redacted] die specifieke [redacted] targeten, dmv intracraniale

injecties. Als controle wordt [REDACTED] gebruikt. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat meer dan 1 kruising [REDACTED] in specifieke celpopulatie) een phenotype geeft, wordt er gekozen voor gencorrectie op maximaal 2 celtypes (= 2 genconstructen).

- Poweranalyse: Gebaseerd op eerdere studies [REDACTED] die hebben gekeken naar verbeterd fenotype van muizen met een [REDACTED] na behandeling met intracraniale injecties, is een poweranalyse uitgevoerd en berekend dat per conditie 4 nestjes nodig zijn: Controle (saline): gemiddelde overleving is 135 dagen, behandeld is de gemiddelde overleving is 171 dagen. St.dev.: 40, desired power: 0.8
  - 20 dieren per groep. Per nest worden 5 tot 6 dieren geboren; dus 4 nestjes (20 dieren) per groep per leeftijd. Indien er meer dieren worden geboren, worden die wel gebruikt in het experiment, dus wordt verder met 24 dieren gerekend
- Maximaal aantal dieren: 3 injecties (2 genconstructen, [REDACTED] x 1 leeftijd (~5 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 120 - 144 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met [REDACTED] wordt getest, zal dit 80 - 96 dieren zijn.

#### Stap b:

- Wanneer dieren op ~5 maanden (Stap 1) een verbeterd fenotype vertonen, zullen meerdere leeftijden worden bekeken tot maximaal het humane eindpunt.
- Aantal dieren: 3 injecties (genconstruct, [REDACTED] x 2 leeftijden (~2 maanden, max humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 240 - 288 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met [REDACTED] wordt getest, zal dit 160 - 192 dieren zijn.

## B. De dieren

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

Muis, mus musculus en genetisch gemodificeerde muizen.

[REDACTED] conditionele [REDACTED] muizenstam

Muislijnen die [REDACTED] cellen tot expressie brengen

Alle dieren zijn afkomstig van erkende fokkers EU/USA of eigen fok.

Maximaal **592** dieren.

Levensstadia: pups (beide sexen) welke spontaan worden geboren en welke op dag 0 of 1 worden behandeld.

Dieren vanaf ca 8 weken tot leeftijd ca 2 maanden (=zonder klinische symptomen), ~5 maanden (= de leeftijd waarop de eerste klinische symptomen zichtbaar zijn als 'wiebelig loopje'); en ~7- 12 maanden

## 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:** Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan lymfoblasten (gekweekte wittebloedcellen) van [REDACTED] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit celtipe geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect.

Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met fibroblasten van patiënten (gekweekte huidcellen). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. ■■■ is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van ■■■ patiënten tijdens het leven. Onderzoek van ■■■ is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast kunnen wij niet vrijelijk therapeutica uitproberen bij levende patiënten. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (mn. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

#### **Vermindering:**

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Van het uitgenomen materiaal (breintjes) wordt alles gebruikt voor verdere ex-vivo analyse. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

#### **Verfijning**

Zodra blijkt dat na interventie significante fenotypische veranderingen worden waargenomen, zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar wordt.

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.

Het neurologisch fenotype van muizen met ■■■ uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren gemakkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

## **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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

## **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.

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Indien nodig worden mannelijke muizen solitair gehuisvest om onderling vechten te voorkomen.

### **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.



symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

10%

### K. Classificatie van ongerief

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

**Tabel 2: ongerief per handeling**

A. handeling:	B. kwalificatie <i>terminaal/licht/matig/ernstig</i>	C. duur v.h. ongerief
Intracraniale injectie pups	Matig (onder <b>hypothermie</b> )	10 min.
██████████	Licht	3x 5 min
██████████	Licht	4x 5 min
Doden (Cervicale dislocatie of terminale anesthesie, uitname organen)	Licht of terminaal	Eenmalig, max 1 min.
██████ fenotype	Max. Matig	2-7 maanden

**Het cumulatief ongerief is 'matig' voor 100% van de dieren.**

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De breintjes moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyses, een deel van de pups wordt onder anesthesie geperfundeerd om de breintjes geschikt te maken voor immunohistochemie.

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

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

#### 1 Algemene gegevens

1. Vul uw deelnemernummer van de ANVVA in.
1. Vul de naam van de instelling of organisatie
1. Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
2	Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] routes

*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.

Gebaseerd op uitkomsten van eerdere experimenten in onze groep zal verder onderzocht worden wat de moleculaire mechanismen zijn achter de ziekte [redacted]. Hierbij hopen we de effecten van selectieve mutaties van het enzym [redacted] op te helderen, en nieuwe aanwijzingen te vinden voor therapie in patiënten. De experimentele set-up gaat hierbij dieper in op de mechanismen en de invloed van [redacted] routes op [redacted].

De primaire uitkomst parameters zijn:

- In-vivo: [redacted]
- Ex-vivo: [redacted]
- Ex-vivo: [redacted]

**Hoofdvraag:** hoe leiden mutaties van het enzym [redacted] tot het disfunctioneren van [redacted] en klinische verschijnselen in muizen met [redacted] (hierna aangegeven als "ziekte").

**Aanpak:** door [redacted] routes die door [redacted] gereguleerd worden te veranderen en vervolgens de effecten op klinische ziekte verschijnselen en de hersenpathologie te onderzoeken.

We weten dat één van de door [redacted] beschreven in de projectbeschrijving, actiever is in [redacted] en [redacted] van muizen en mensen met [redacted] dan in controles. Op dit moment weten we echter niet of veranderde [redacted] en aanverwante [redacted] oorzakelijk bijdrage aan "ziekte" of dat ze juist beschermend werken maar tekort schieten met [redacted] als gevolg. Wij weten nog niet welke onderdelen van de door [redacted] gereguleerde routes belangrijk zijn in [redacted] en hoe (gunstig of ongunstig). Daarnaast kunnen

andere routes ook aan [redacted] "ziekte" bijdragen of beschermen tegen "ziekte". **Voor het ontwikkelen van [redacted] therapie is het belangrijk om beter begrip te hebben van het mechanisme hoe mutaties van [redacted] en hoe veranderingen in door [redacted] routes bijdragen aan [redacted]**

**Op dit moment wordt experiment 1 in deze bijlage al uitgevoerd gebaseerd op een DEC project [redacted]**

**N.B.** Dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 i.v.m. de fok van voldoende dieren voor experimenten. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een (tijdrovend) amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

**In experiment 1** worden de [redacted] en [redacted] eerst gemoduleerd met een farmacon [redacted]

In vervolggelaxperimenten willen we de bijdrage van [redacted] routes verder uitzoeken door een [redacted] interventie (door gebruik te maken van [redacted] muizenstammen, beschreven in 2A) en [redacted] modulatie (beschreven in 2B). Ook kan de bijdrage verder onderzocht worden met een aangepast [redacted] in andere concentraties worden toegediend (beschreven in 2C). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [redacted].

Op basis van de uitkomst uit experiment 1 zijn de vervolggelaxperimenten beschreven in 2A, 2B en 2C waarbij de GO/NO-GO gekozen worden op de basis van gegevens uit de experimenten: moet voor herstel van het fenotype de [redacted]. Als een gekozen aanpak niet werkt, zal deze aanpak niet verder onderzocht worden in deze bijlage noch andere bijlagen van het projectvoorstel.

#### **Resultaten welke verwacht kunnen worden uit experiment 1**

**resultaat 1A:** 20% remming van de [redacted] en ziekte parameters (>50% verbetering op mobiliteitstesten) in de [redacted] muismodellen nemen af of blijven gelijk.

**Interpretatie:** De [redacted] route causaal bijdraagt aan de klinische verschijnselen, histologische en moleculaire afwijkingen in de [redacted] muismodellen (tezamen aangeduid als "ziekte"). Indien er alleen remming van de [redacted] gevonden wordt, zonder verbetering in mobiliteitstesten blijkt dat [redacted] activatie feitelijk beschermt tegen de ziekte maar mogelijk onvoldoende en dat [redacted] deze bescherming overneemt.

**Vervolg na resultaat 1A:** bijdrage van [redacted] aan de ziekte verder ontrafelen met een [redacted] interventie (door gebruik te maken van genetisch gemodificeerde muizen, beschreven in 2A) en moduleren met een [redacted] aanpak (beschreven in 2B). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [redacted] op de ziekte parameters. Specifiek kan verder onderzocht worden of de ziekteverschijnselen verminderen met een [redacted] aanpak, die gebaseerd is op aanpassing (verlaging) van [redacted] (beschreven in 2C) of de ziekteverschijnselen verbeteren.

Indien beide parameters [redacted] is dat een NO-GO voor experiment 2C. Doordat resultaat 1A een duidelijk effect heeft op de [redacted] kunnen we in bij experiment 2A het aantal kruisingen beperken en worden 240 dieren bespaard.

**Resultaat 1B:** [redacted] beïnvloedt de [redacted] activiteit niet significant [redacted] en deze activiteit is onvoldoende om de ziekte parameters te veranderen in de [redacted]. Het experiment levert geen bruikbare resultaten op die aantonen of de routes de ziekte veroorzaken of beschermend werken tegen ziekte.

**Vervolg na resultaat 1B:** In geval van resultaat 1B worden de [redacted] verder onderzocht door een [redacted] interventie met behulp van [redacted] knock-out muizen stammen (beschreven bij experimentele opzet 2A) gecombineerd met een [redacted] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2B) of [redacted] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2C).

**Resultaat 1C.** [redacted] vermindert de ziekte parameters wel significant. Onduidelijk blijft of [redacted] bij resultaat IV een gunstig effect had op de ziekte via [redacted] (on-target of specifiek effect) of via een nog onbekende target (off-target of aspecifiek effect). Deze onduidelijkheid zal dan worden onderzocht op patiënten materiaal of materiaal verkregen met experiment 1.

**Vervolg na resultaat 1C:** In geval van uitkomst 1C worden de nieuw [redacted]



moduleren verder onderzocht op basis van dan beschikbare gegevens uit literatuur. Indien mogelijk kiezen we voor een [redacted] interventie zoals beschreven bij 2A, 2B en 2C. De interventie is er op gericht om de nieuw ontdekte functie/route zodanig te moduleren dat de ziekteverbetering geobserveerd bij [redacted] toediening bevestigd wordt en verder ontrafeld wordt.

**Resultaat vragen 2A, 2B, 2C:** Uit de vervolgresultaten gegenereerd in experimenten 2A, 2B en/of 2C wordt een geschikte moleculaire target voor [redacted] geïdentificeerd in de muismodellen. In dat geval willen we een laatste proef uitvoeren die sensitief de genexpressie meet in selectief die cellen die verantwoordelijk voor ziekte zijn zoals bepaald in bijlage 1 (cel-autonomie) en waarbij het verantwoordelijke gen niet langer aanwezig is (bepaald in aanpak 2A). Deze proefopzet is beschreven bij vraag 3. We kunnen met dit experiment bevestigen of eerder vastgestelde afwijkingen in genexpressie cel-specifiek worden bevestigd en gecorreleerd kunnen worden aan ziekte parameters.

**Vraag 3:** Wat gaat er cel-specifiek mis als gevolg van de [redacted] mutatie op het niveau van [redacted] en [redacted] en functies? Dit wordt onderzocht in een muismodel waarin de [redacted] label staat toe dat we

[redacted]. Uit dit experiment blijkt wat er cel-specifiek mis gaat als gevolg van de [redacted] mutatie op het niveau van [redacted] en functies. Door deze proef komen alle gegevens samen en beantwoorden we de onderzoeksvraag concreet (hoe mutaties in [redacted] leiden tot het disfunctioneren van [redacted] muizen).

**Het resultaat van 2A, 2B, 2C en 3 samen zal tot identificatie van een moleculair therapeutische interventie leiden die geschikt is voor verdere ontwikkeling voor de humane patiënt.**

**Uitkomst parameters voor alle vragen (1, 2A-C en 3) in detail met in bold de primaire uitkomst parameters:**

*In vivo en ex vivo* zal onderzocht worden of mutant [redacted] een aangrijpingspunt is van o.a. [redacted] Onderzocht zal worden of de gemoduleerde [redacted] activiteit en [redacted] routes de onderstaande parameters beïnvloeden. Na het vaststellen van een behandelings-effect (of na de maximale behandelduur) worden de hersenen en overige organen.

- **Klinische fenotypering door middel van dagelijkse observaties, wegen en standaard mobiliteit (motorische) testen. Zodra er een significant verschil wordt gemeten stopt het experiment.** [redacted]

[redacted] Deze testen worden gebruikt om de mobiliteits- en krachtveranderingen bij deze dieren te kunnen meten. Deze testen geven maximaal licht ongerief en hebben geen nadelige gevolgen voor de dieren.

- Pathologie van uitgenomen hersenen (immuun) histologie
- Genexpressie in hersenen (moleculaire analyses: [redacted])
- Genexpressie en celmorfologie in overige organen (bijv. lever, nieren en pancreas) voor analyses van eventuele neveneffecten van de interventies.

De bovengenoemde (vervolg) experimenten zijn hieronder opgesplitst in twee tabellen. **Tabel 1** beschrijft het nu al lopende experiment. **Tabel 2** bevat de interventies bij de hierboven besproken verschillende type experimenten: [redacted] aanpak (2A), [redacted] interventies d.m.v. kruisingen (2B) en [redacted] aanpak (2C). Experiment 2 omschrijft de samenvatting wat bij de interventie [redacted] targetmodulatie wordt 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.

**Tabel 1: Interventies bij experiment 1: [redacted] modulatie van de [redacted] route [redacted]**

Interventie door middel van [REDACTED]	Toedienings- Route, frequentie	Behandelduur
[REDACTED] test groep* of controle groep	I.P. 1x per dag*	Max. 12 maanden
mobilitiestesten	Max. 4	Max. 10 minuten per test
Bloedafnames (wangprik of staart max volume enkele druppels)	Max. 2x, met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname

\* ) **N.B. Nogmaals**, dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 ivm de fok van voldoende dieren voor experiment. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

**\*Toelichting:**

Dieren worden dagelijks i.p. met [REDACTED] of controle vehiculum behandeld gedurende maximaal 6 maanden (voor de [REDACTED] muizen ) of maximaal 12 maanden (voor de [REDACTED] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken (presymptomatisch). Er is ruime ervaring met het zeer langdurig i.p. injecteren van muizen, waarbij retrospectief samen met de IvD het ongerief op matig is vastgesteld. [REDACTED] wordt in zuivere vorm en in [REDACTED] geschikt oplosmiddel toegediend, zodat verklevingen in de buikholte worden voorkomen. De [REDACTED] muis vertoont het [REDACTED] fenotype op een eerdere leeftijd waardoor effecten sneller zichtbaar zijn, maar ook de kans bestaat dat eerder een humaan eindpunt moet worden toegepast. De [REDACTED] muis vertoont het fenotype op een latere leeftijd, waardoor effecten pas na langere tijd duidelijk zichtbaar zijn.

**Tabel 2: Overzicht van behandelingen uitgevoerd in experimenten 2A, 2B, 2C en 3.**

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur
2A: [REDACTED] behandeling	injectie i.p. oraal, i.v. of s.c.	Max. 1x daags	Max. 12 maanden
2B: [REDACTED] interventies	Kruisen muizenstammen; dagelijkse observaties	Max dagelijkse observaties	Max. 1 jaar of HEP
2C [REDACTED] interventies	Aangepast dieet	Dagelijks	Max. 1 jaar
2A, 2B, 2C, 3	mobilitiestesten	Max 4 x	Max. 10 minuten per test
2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max 2 x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname
2 A, 2B, 2C, 3	Doden (cervicale dislocatie of terminale anesthesie, uitname organen)	Eenmalig	Max 1 min

**Toelichting interventies:**

- **Mobiliteitstesten (max licht ongerief)**

Mobiliteitstesten ([REDACTED]) zoals [REDACTED] eerder gepubliceerd.

- **Bloedafname tbv analyse farmacon/dieet:** de concentratie [REDACTED] wordt tijdens het experiment in bloed (afgenomen middels wangprik) bepaald en aan het einde in bloed en in de hersenen aan het einde van het experiment gemeten (terminaal bloedmonster).

- [REDACTED]  
Zie toelichting bij Experiment 1 ([REDACTED])

- [REDACTED]

Dieren worden met een [redacted] behandeld waarin [redacted] vanaf jonge leeftijd tot een leeftijd van maximaal 6 maanden (voor de [redacted] muizen) of maximaal 1 jaar (voor de [redacted] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. Dagelijkse tot wekelijkse observaties van de dieren afhankelijk van dieet (bij dagelijks voerafwegingen ook dagelijkse observatie van gewicht en diergedrag).

- **Ex-vivo analyses op breintjes** m.b.v. (immuun) histologie en gen/eiwit analyses ([redacted]). Breintjes worden histopathologisch geanalyseerd. Met de resultaten uit bovengenoemde experimenten kunnen we uitzoeken of de [redacted] interventie gunstig of ongunstig zal zijn op [redacted] pathologie.

### Toelichting experiment 3

We kunnen met de gegevens uit bijlagen 1, 2 (experimenten 2A-C) en 3 een verfijning aanbrengen in de [redacted] analyse om een duidelijke afwijking van een moleculaire route specifiek in de aangetaste cel-populatie in het [redacted] brein (bepaald in bijlage 1). Dit experiment is conditioneel aan de bevindingen uit bijlage 1 (welk cel-autonome lijn bootst het best de [redacted] ziekte in muizen na) en uit bijlage 2 (onderdeel 2A-C). In een pilot zullen we de specificiteit van de [redacted] bepalen middels histologie. We zullen de lijn bij GO (voldoende [redacted] expressie) door de tijd volgen en de analyses uitvoeren op 3 leeftijden (1-2 maanden [presymptomatisch], 4-5 maanden [mild symptomatisch], maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). Bij de laatste leeftijd zullen we ook mobiliteitstesten uitvoeren. Dit laatste experiment geldt als "proof of the pudding" waarbij eerder vastgestelde afwijkingen in [redacted] worden bevestigd en [redacted] gecorreleerd kunnen worden aan ziekte parameters.

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

In het algemeen geldt voor de experimenten in deze bijlage:

N=16 per testgroep voor mobiliteitstesten (op grond van literatuur gegevens ([redacted]), waarvan na afloop n=11 - 12 door cervicale dislocatie worden geëuthanaseerd voor moleculaire analyses en histologie op vers weefsel en n=4 voor perfusie onder anesthesie [voor histologische analyses] (totaal n=16).

### Power analyse van analyse van genexpressie voor pilot vermeld bij 2A:

De [redacted] analyse methode voor [redacted] is het moeilijkst meetbaar voor target [redacted]. Wij willen een verschil van 15% kunnen meten (wt en mutant verschillen zonder interventie 20% van elkaar). De standaard deviatie is 0,001772, gemiddelde expressie in [redacted] dieren is 0,025667. Op basis van deze getallen komen wij op een noodzakelijk aantal dieren van 4.

## B. De dieren

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

**Diersoort:** muis (mus musculus) en genetisch gemodificeerde dieren, afkomstig van leveranciers of onderzoeksgroepen of eigen fok.

### Muizenstammen:

Controle stammen: C57BL/6J, [redacted]  
Kruisingen: C57BL/6J x test lijn, [redacted] x test lijn en [redacted] x test lijn  
Testlijnen: bijvoorbeeld [redacted]  
Deze muizenlijnen hebben van zichzelf geen fenotype.

**Herkomst:** eigen fok of aanschaf via officiële leverancier of onderzoeksinstituut.

**Sekse:** mannetjes. Een van de parameters is [redacted] analyses. Door verschillen in o.a. [redacted] is statistische analyse van deze experimenten ondoenlijk als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons

inziens noodzakelijk.

**Tabel 3: Totaal aantallen dieren:**

Experimenten	Minimum aantal	Maximum aantal
1	68	68
2A	96	168 + 672
2B	96+48	720
2C	384	1344
3	12	12 + 96
<b>Totaal</b>	<b>704</b>	<b>3080</b>

Aantallen en levensstadia worden hieronder uitgelegd per experiment.

#### **Experiment 1:**

De dieren gebruikt in experiment 1 liggen vast (n=68 in totaal) omdat dit een lopend experiment betreft op

een 'oude' vergunning (<14 dec 2014). De aantallen zijn hier wel meegenomen omdat het experiment waarschijnlijk doorloopt in 2018. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken en duurt maximaal 6 maanden voor ██████ en 12 maanden voor ██████.

#### **Experiment 2A:**

##### **Aantallen pilot:**

Per kruising van C57BL/6J, ██████ en eventueel ██████ x een gen-specifieke lijn (3 test lijnen) en 3 controle lijnen C57BL/6J, ██████ en eventueel ██████ (6 lijnen in totaal):

Groepsgrootte: Pilot n=4, minimaal 4, maximaal 6 lijnen per kruising (maximaal 4x6=24 dieren).

Deze flow wordt minimaal voor 4 (bij resultaat 1D) en maximaal voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij Resultaat 1C) [Tabel 2a en 2b]. In totaal (alle kruisingen maximaal ingeschat):

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen, pilots  $6 \times 4 \times 5 = 120$  muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen Pilots  $6 \times 4 \times 7 = 168$  muizen;

##### **Aantallen karakterisering nieuwe lijnen:**

Controle lijnen: C57BL/6J, ██████ en ██████

Testlijnen: C57BL/6J x test lijn, ██████ x test lijn en ██████ x test lijn

Groepsgrootte:

Aantal dieren voor overleving en mobiliteitstesten is n=16 per groep. Deze flow wordt maximaal voor vijf kruisingen (bij Resultaat 1A of 1C) of voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij GO Resultaat 1B).

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen,  $6 \times 16 \times 5 = 480$  muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen:  $6 \times 16 \times 7 = 672$  muizen;

Als twee of meer lijnen tegelijk gekruist kunnen worden, kunnen de F1 van de kruisingen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 controle groep. Deze opzet vermindert het aantal dieren met 48 (1 controle groep is 48). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten of de kruisingen tegelijk kunnen worden uitgevoerd.

In de lijnen worden de ziekteparameters onderzocht vanaf een jonge leeftijd tot een maximale leeftijd (1 jaar voor ██████ en C57BL/6J en 6 maanden ██████) of eerder bij humaan eindpunt.

#### **Experiment 2B:**

Per experiment 3 behandelingen: 2 controle (vehiculum en farmaconspecificiteit) en 1 testbehandeling (stof als ██████). Gebruikte Lijnen: 2 Testlijnen: ██████ : n=16 (mobiliteitstesten) per groep,

2 Controle lijnen: C57BL/6J en bijv ██████ x target-gen omlaag: n=8 per controle groep per behandeling,

Aantal dieren is maximaal:  $3 \times 2 \times 16 = 96$  dieren (test) en  $3 \times 2 \times 8 = 48$  (controle) is totaal maximaal 144 dieren per experiment. Er zullen maximaal 5 verschillende experimenten worden uitgevoerd:  $144 \times 5 = 720$  dieren. Als een vehiculum gedeeld kan worden (bijv vehiculum van stof A en B is saline), kunnen 2 stoffen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 vehiculum injectie controle groep. Dit scheelt dan 48 dieren (2 controle groepen van 8 en 2 lijnen uit test groep van beide 16 =>  $2 \times 8 + 2 \times 16 = 48$ ). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten welke stoffen we gaan testen.

### Experiment 2C:

Per experiment 3 lijnen: 1 controle lijn: C57BL/6J en 2 test lijnen: [redacted] en [redacted] Dieraantallen: n=16 (mobiliteitstesten / overleving per groep).

Behandelingen: Maximaal 18 test behandelingen, zoals [redacted] en [redacted] (4 aminozuren, 4 verschillende concentraties).

Minimaal 2 maximaal 10 controle behandelingen: [redacted].

Mogelijk is het niet logistiek haalbaar om dit in 1 experiment uitvoeren en zullen we het experiment opsplitsen in 5 onderdelen ([redacted]). Het aantal controle behandelingen neemt dan toe van 2 naar 10.

Totaal aantal dieren is minimaal (alles parallel, met gedeelde controle behandelingen):

3 lijnen x 20 behandelingen x 16 dieren (n=960)

Totaal aantal dieren is maximaal (5 rondes, met 10 controle behandelingen):

3 lijnen x 28 behandelingen x 16 dieren (n=1344)

### Experiment 3:

[redacted] met 3 testlijnen:

[redacted] x conditionele-CRE x [redacted], C57Bl/6J x [redacted], Lijn 2A x [redacted] x [redacted] en 3 controle lijnen (alleen voor pilot): [redacted] C57BL/6J en de lijn die uit 2A komt (Lijn 2B x [redacted])

- Pilot experiment (is [redacted] en beïnvloedt de [redacted] [redacted]) Per groep: 2 dieren per lijn, 1 leeftijd 4-5 maanden oud. Histologische analyse (aantonen of de cellen specifiek [redacted] brengen). Aantal dieren is 2 dieren x 6 lijnen=12 dieren.
- **Als** de [redacted] zoals verwacht [redacted] tot expressie komt en geen onverwacht ongerief geeft, **dan** zal [redacted] analyses in hersenen van mannelijke dieren worden uitgevoerd op de 3 testlijnen, met 8 dieren per lijn, 2 leeftijden ((1-2 maanden [presymptomatisch], 5 maanden [mild symptomatisch], en 16 dieren voor mobiliteitstesten per lijn bij leeftijd maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). 8 dieren zijn naar alle waarschijnlijkheid nodig voor het isoleren van [redacted]-ribosomen (eerder hebben we [redacted] analyses op heel brein zonder [redacted] uitgevoerd op n=4). Aantal dieren is 8 dieren x 3 lijnen x 2 leeftijden + 16 x 3 x 1 leeftijd= 96 dieren.

### 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:

[redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast is het niet wettelijk toegestaan noch ethisch verantwoord om [redacted] bij mensen toe te passen indien proefdieronderzoek niet heeft uitgewezen dat de middelen veilig en effectief zijn. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (mn. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

**Vermindering:**

Bij het creëren van nieuwe lijnen door kruisingen (2A, 3) zal een Pilot experiment in n=4 per lijn worden uitgevoerd om afwezigheid van extra ongerief te bevestigen. We beslissen dan of de [REDACTED] lijn [REDACTED] noodzakelijk is om te genereren, waarbij we snel tot een keuze komen welke genetisch gemodificeerde muizen voor verdere analyses gebruikt worden.

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Door kruisingen van verschillende lijnen tegelijk uit te voeren kunnen we het aantal controle dieren terugbrengen met 48. Bij [REDACTED] interventie studies zal waar mogelijk een naïeve, onbehandelde groep (controle groep) dier worden weggelaten indien ook een groep dieren met een passend vehiculum als saline wordt meegenomen. Dit alles zal met de IvD worden afgestemd.

**Verfijning**

Zodra blijkt dat fenotypische veranderingen na interventie significant worden waargenomen zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar wordt.

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.

Het neurologisch fenotype van muizen met [REDACTED] uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren makkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

## 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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

## 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.

Mannelijke dieren worden solitair gehuisvest i.v.m. onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting.

**G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het dagelijks i.p. behandelen wordt door zeer ervaren biotechnici uitgevoerd, waarbij is vast gesteld dat het meeste ongerief wordt veroorzaakt door oppakken van de dieren. Retrospectief werd daarbij het ongerief op maximaal matig (na maanden toedienen) vastgesteld. Er worden geen complicaties verwacht doordat de [REDACTED] zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken [REDACTED] ongerief veroorzaken. Het fenotype [REDACTED] is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Kenmerken van [REDACTED] in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water) en geringe gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren. Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.

De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

### 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.

De criteria voor de humane eindpunten zijn als volgt gedefinieerd: 15% gewichtverlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

Ca. 20%: zou maximaal verwacht kunnen worden bij [redacted] dieren die worden behandeld met controle [redacted] of vehikel of die geen genetische aanpassing hebben.

### 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.

#### Inschatting ongerief per experiment:

**Tabel 4: Inschatting ongerief per handeling:**

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur	Maximaal ongerief
1 & 2A: [redacted] behandeling	injectie i.p. oraal, i.v. of s.c.	Max. 1 * daags	Max 12 maanden	Licht of matig; afhankelijk van de duur. Zodra er een effect wordt gezien stopt de behandeling
2B: [redacted] interventies	[redacted] muizenstammen; dagelijkse observaties	Max dagelijkse observaties	Max. 12 maanden	Max. matig
2C [redacted] interventies	Aangepast [redacted]	Max dagelijkse observaties	Max. 1 jaar	Max. matig
1, 2A, 2B, 2C, 3	mobilitiestesten	Max. 4x	Max. 10 minuten per test	licht
1, 2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max. 2x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname	licht
1, 2 A, 2B, 2C, 3	Doden (cervicale dislocatie of terminale anesthesie, uitname organen)	eenmalig	Max. 1 min	Licht of terminaal
1, 2A, 2B,2C, 3	[redacted] Fenotype als gevolg van mutatie		~2-7 maanden	Max matig

**Tabel 5: Maximale cumulatieve ongerief in % van gebruikte dieren in deze bijlage**

Aantal dieren	% met ongerief "licht"	% met ongerief "matig"
Maximaal 3080	Max. 20%	Max. 80%

De behandelingen zijn in principe gericht op verbetering van het fenotype van [redacted] [redacted] [redacted] lijnen.

Vóórdat ernstig ongerief optreedt zullen de muizen geëuthanaseerd worden (=HEP), het totale ongerief is dus maximaal matig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De hersenen moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyse.

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

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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   |
|------------|--|
| 3          | Verbetering van <input type="text"/> functie: ex-vivo analyses na isolatie van o.a. <input type="text"/> uit muizen met <input type="text"/> in celkweek |
- 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.

We willen de mRNAs/eiwitten opsporen die een veranderde  vertonen in muizen met  ten opzichte van wild-type (WT) dieren, omdat deze mogelijk een rol spelen bij de ziekte. Dit gebeurt met ex-vivo analyse van [patiënten materiaal](#) en in parallel met muizen materiaal.

#### Ex-vivo onderzoek op hersenen van onbehandelde muizen met en WT controles:

**A1&3:** Ex-vivo (in celkweek) worden de volgende parameters onderzocht op coupes van hersenen uit muizen tussen genotypen en regio's:

- de mate van schade,
- specifiek de  regio's;
- de mate van  door middel van fluorescentie immunohistochemie.

**A2:** Ex-vivo eiwit analyse met behulp van gefocuste  van  geïsoleerd uit muizen van verschillende leeftijden/ziektestadia in  (leeftijd ~P0, ~P14, ~P42, ~P90, ~P120, ~P196, en max ~12 maanden of eerder op het humane eindpunt).

- . Hierbij wordt bepaald welke eiwit(ten) veranderd is (zijn), gerelateerd aan verschillen in .
- **Belangrijk is de translationele aanpak:** Om de resultaten die we in de muizen vinden te

valideren zullen we eenzelfde [redacted] uitvoeren op menselijk materiaal (hersensneden van [redacted] patiënten van verschillende ziekte ernst ten opzichte van controles) en onderzoek doen naar het [redacted]

**B:** Wat is de impact van [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] (mbv celkweek): uitleesparameters: [redacted] activatie wordt bepaald met immuun fluorescentie, flow cytometrie en sandwich ELISA voor een aantal standaard [redacted] markers. Daarnaast zullen de zelfde experimenten worden uitgevoerd met [redacted] van [redacted] stof van patiënten en controles; de cellen zijn al aanwezig in het lab.

**C:** Wat is de impact van [redacted] astrocyten op de [redacted]? Dit betreft ex-vivo onderzoek op breintjes van muizen met [redacted] in verschillende ziekte stadia. [redacted]

**D1** Bestudering van [redacted] kweken na behandeling met verschillende [redacted]. Primaire uitkomst parameters: [redacted]. 3D kweken zijn geschikt voor al deze doeleinden en de technieken en analyses al geoptimaliseerd.

**Go / no-go:** als AI en AII geen significant resultaat laat zien

**A4: In-vivo** inductie het endogene herstelpotentieel bij diverse [redacted] in vivo bestudeerd bij ~5 maanden oude [redacted] en WT muizen waarbij [redacted] (controle) geïnduceerd.

- Uitleesparameters: ex-vivo op hersen materiaal:

- [redacted]

**In-vivo onderzoek op hersenen van behandelde muizen met [redacted] en WT controles:**

**D2: in-vivo:** onderzoek naar [redacted] en [redacted] in de witte stof in het [redacted] van ~5 maanden oude muizen na behandeling van [redacted] vs. controle dieren. Uitkomst parameters: celproliferatie en reactie (reactive gliose) op dag 1, 5 (complete schade), 14, 21 (piek van weefsel remodelling), en ~40 dagen (compleet herstel) op coupes van hersenen. Na de behandeling wordt per tijdstip een deel van de muizen geëuthanaseerd en zullen de hersenen histologisch worden onderzocht.

**Haalbaarheid:** Alle noodzakelijke apparatuur is beschikbaar, en technieken en analyses zijn al geoptimaliseerd. Daarnaast zal de differentiële expressie in [redacted] en WT muizen van [redacted] uit punt A bevestigd worden. We willen muizen van verschillende leeftijden analyseren (~2 maanden: pre-symptomatisch stadium; ~5 maanden: gering klinisch symptomatisch stadium; ~12 maanden: evident klinisch symptomatisch stadium) om de relatie tussen [redacted] falen en [redacted] in kaart te brengen.

**Translationeel:** Daarnaast worden dezelfde experimenten uitgevoerd met [REDACTED] afkomstig uit [REDACTED] van [REDACTED] patiënten en controles. Deze cellen zijn al aanwezig in het lab om de muisdata met de humane situatie te vergelijken en de ziekte-specificiteit van de bevindingen te bepalen.

Wij verwachten dat [REDACTED] astrocyten geen normale interactie vertonen met endotheelcellen en dat [REDACTED] inductie en onderhoud bij [REDACTED] defect zijn. Wij zullen aantonen of een afwijkende eiwitexpressie hieraan ten grondslag ligt.

**Humaan:** de bevindingen van bovengenoemde experimenten zal worden bevestigd in menselijke [REDACTED] hersenweefsel en de specificiteit zal worden beoordeeld door vergelijking met andere [REDACTED] gekenmerkt door robuuste of juist onvoldoende [REDACTED].

**Uit de experimenten uit bijlage 3 moet duidelijk worden welke [REDACTED] responses en [REDACTED] het succes of falen van [REDACTED] bepalen.**

**Referenties:**

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

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.

Het betreft hier bijna volledig ex vivo analyses, op muizen in verschillende ziekte stadia (leeftijd) met wild type controles. De enige handeling, welke hier van toepassing is, is het doden van dieren op verschillende leeftijden om weefsel voor ex vivo analyses te verzamelen.

**Tabel 1: Overzicht behandelingen, frequentie en duur per experiment**

Experiment	Handeling	Duur	Frequentie
A1, A2, A3	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
A4	Intracraniele [REDACTED] onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Doden: uitname organen na doden		
B	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
C	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
D1	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
D2	Of: Intracraniele behandeling, [REDACTED] onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Of: steekwond schade onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig

**Uitleg van behandelingen:**

**Dieren waarin ook in-vivo handelingen worden verricht:**

**Experiment A4:** [REDACTED] in vivo (alleen als A2 en A3 geen duidelijk resultaat laat zien)

Eenmaal intracraniale behandeling (injectie) met [REDACTED]

Gebruik van [REDACTED] en WT muizen (dag 0, 3, 7,14, 21 na behandeling).

Gebruik van mannelijke dieren voor [redacted] analyse, en van dieren van beide geslachten voor immunohistochemie (IHC).

**Experiment D1: 3D in vitro model van [redacted]**

Geen behandeling in vivo, alleen uitname breinen.

Gebruik van [redacted] en WT muizen P0-P3 van beide geslachten. We hebben perinataal weefsel nodig omdat hersenplakjes van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

**Experiment D2: [redacted] in vivo**

Eenmalig behandeling in vivo met [redacted].

Op dag 1, 5 (complete schade), 14 [redacted]), 21 (piek van weefsel [redacted]) en ~40 dagen (compleet herstel) na de verwonding zal een deel van de muizen worden geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie en zullen de hersenen worden ingevroren of in paraffine ingebed voor microscopisch onderzoek. Tevens op dag 5 (complete schade) en 21 (piek van [redacted]) na de verwonding zal een deel van de muizen worden geëuthanaseerd en zullen de hersenen worden gebruikt voor [redacted] analyse en daarna [redacted] voor validatie van de [redacted] resultaten.

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

Uit ervaring en uit literatuurgegevens zijn de berekende aantallen gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die nodig is voor de ex-vivo analyses per parameter. Daar waar mogelijk worden meerdere parameters in een brein onderzocht. .

Voor poweranalyse: alpha 0.05, 1-beta 0.8, Zalpha/2 1.96, Zbeta 0.84.

**Punt A1: [redacted] behandeling van [redacted] hersenplakken.**

Hersenplakjes van 300 µm; parameters: [redacted].

$n\text{-needed} = 2*((Z\alpha/2+Z\beta)*SD\ 0.1/diff\ 0.1)^2 = 16$

**Punt A2: Single-cell [redacted].**

Isolatie van [redacted]; ongeveer 50 cellen [redacted] uit een 6µm-dik plakje, ongeveer 20 plakjes kunnen gesneden worden uit een brein; 3000 cellen (dus 3 hele breinen) noodzakelijk per sample voor [redacted].

3 experimenten, 7 levensstadia, 3 breinen = 63 breinen per genotype (geen statistische overwegingen)

Validatie experimenten [redacted])

4 breinen (1 helft voor [redacted] en 1 helft voor [redacted]/genotype

7 levensstadia/genotype

21 breinen per genotype

$n\text{-needed} = 2*((Z\alpha/2+Z\beta)*SD\ 0.05/diff\ 0.1)^2 = 4$  voor validatie

**Punt A3: [redacted] co-kweken.**

De [redacted] worden uit E18 Bl6 pups geïsoleerd (beide geslachten). Bij het aantal muizen wordt voor 1 E18 nestje, 1 muis (moeder) gerekend. Een E18 nestje (gemiddeld 6 pups) geeft ~  $6 \times 10^7$  cellen. Na sorting blijven er ~  $1.8 \times 10^6$  [redacted] cellen over. Om genoeg OPC cellen te genereren voor 1 experiment hebben we naar verwachting 2 E18 nestjes nodig. [redacted] worden geïsoleerd uit [redacted] van E18 WT of [redacted] pups. Op basis van de mate van de regio, zijn er 1 nestje nodig voor de [redacted] maar 2 nestjes nodig voor de [redacted] (die een veel kleinere [redacted]).

Herhaling van experiment (n): 4

Aantal muizen: (4 (n) x 2 (nestjes; [redacted] x 2 (nestje: WT + [redacted])) = 16 muizen

$n\text{-needed} = 2*((Z\alpha/2+Z\beta)*SD\ 0.1/diff\ 0.1)^2 = 16$

**Punt A4: [redacted] behandeling in vivo.**

[redacted] (mannelijke dieren): 9 breinen (zie boven) x genotype ([redacted] en WT) x tijdstip (voor behandeling en 3, 7, 14 en 21 dagen na behandeling) x behandeling ([redacted]).

\_\_\_\_\_ karakterisatie en \_\_\_\_\_ validatie door middel van \_\_\_\_\_ 6 half breinen x genotype (\_\_\_\_\_ en WT) x tijdstip (voor behandeling en 3, 7, 14 en 21 dagen na behandeling) x behandeling (\_\_\_\_\_) x experiment (\_\_\_\_\_), dezelfde brein kan gehalveerd worden en gebruikt voor beide doelen.

$n\text{-needed} = 2 * ((Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta}) * SD \ 0.34 / \text{diff} \ 0.1)^2 = \mathbf{180}$  voor \_\_\_\_\_

$n\text{-needed} = 2 * ((Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta}) * SD \ 0.34 / \text{diff} \ 0.17)^2 = \mathbf{60}$  voor validatie \_\_\_\_\_

### **Punt B: \_\_\_\_\_ co-cultures.**

We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

Voor immunohistochemie: totaal 18 eiwitten, 3 eiwitten samen kleuren → 6 kleuringen; 1 time point; 4

genotype combinaties: WT astrocyten + \_\_\_\_\_, WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ N=3; 3 experimenten:

→ 1 time point x 6 kleuringen x 3 = N x 3 experimenten = 54 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 6 kleuringen x 3 = N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 216 wells totaal = 9 x 24-well plates totaal

Flow-cytometrie: 1 time point; 4 condities/genotype: WT \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_, WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ N=3; 3 experimenten:

→ 1 time point x 3 N x 3 experimenten = 9 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 3 N x 3 experimenten x 4 genotype combinatie = 36 wells totaal = 1.5 x 24-well plates totaal

\_\_\_\_\_ : totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot \_\_\_\_\_ worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype

combinaties: WT \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_, WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal = 5 x 24-well plates totaal

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de \_\_\_\_\_ worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype

combinaties: WT \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_, WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ + WT \_\_\_\_\_ N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie

→ 1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal = 5 x 24-well plates totaal.

Totaal punt B: Minstens 21 x 24-well plates 123 wells / genotype combinatie; totaal 4 combinaties

→ Totaal 246 wells / genotype (WT of \_\_\_\_\_)

1 muis pup = ca.  $3.5 \times 10^6$  cellen, max passage (P) 2: plate 30.000 cellen/well P0-1, plate 50.000 cellen/well P2. Nodig  $246 \times 50.000 = 12.3 \times 10^6$  cellen, 1 P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca.  $24.5 \times 10^6$  cellen, dus 1 nestje nodig voor een experiment. De fok voor \_\_\_\_\_ is niet anders uitvoerbaar dan \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en \_\_\_\_\_ cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.

Om de drie experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes / genotype (7 pups/nestje) → 21 pups / genotype = 21 WT + 21 homozygote \_\_\_\_\_ + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

### **Punt C1: astrocyt-endothelcellen co-cultures.**

We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

\_\_\_\_\_ 3 experimenten x 6 tijdstippen (2 uur en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen (\_\_\_\_\_ en WT) x N=3: 4.5 x 24 well plates.

\_\_\_\_\_ kolommen: 3 experimenten x 6 tijdstippen (2 h en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen (\_\_\_\_\_ en

WT) x N=3: 4.5 x 24 well plates.

Immuunfluorescentie: 2 experimenten x 6 tijdstippen (2 h en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen (██████████ en WT) x N=3 x 6 kleuringen: 18 x 24 well plates.

Western blot/ELISA: 3 experimenten x 6 tijdstippen (2 h en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen (██████████ en WT) x N=2: 15 x 24 well plates.

Totaal 450 wells per genotype, 900 wells voor beide genotypen = 38x24 well plates, 1 muis pup =  $\sim 3,5 \times 10^6$  cellen. Passage 2: plate 30.000 cellen / well passage 0-1, 50.000 cellen / well passage 2. Noodzakelijk  $450 \times 50.000 = 22,5 \times 10^6$  cellen per genotype, 1 P1-3 nestje geeft  $\sim 7$  pups,  $7 \times 3,5 \times 10^6$  cellen =  $24.5 \times 10^6$  cellen. De fok voor (██████████) is niet anders uitvoerbaar dan null/wt (██████████) x null/null (██████████). Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen (██████████) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment. Om alle experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen  $\rightarrow$  3 nestjes (7 pups/nestje) / genotype = 21 WT + 21 homozygote (██████████) + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

### **Punt C2: onderzoek naar (██████████) in vivo/ex vivo, (██████████).**

Gebruik van dieren van beide geslachten;  $\sim 1$ ,  $\sim 4$  en  $\sim 7$  maanden oude dieren (dieren zonder symptomen, dieren met lichte ziekte, dieren met ernstiger ziekte; om de (██████████) functie te bestuderen door het ziekteverloop en door verschillende maten van ziekte ernst); euthanasie door cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.

(██████████) en andere soorten (██████████) onderzoek, (██████████) bevindingen: 10 halve breinen x genotype (██████████ en WT) x 3 leeftijden ( $\sim 1$ ,  $\sim 4$  en  $\sim 7$  maanden):  $10 \times 2 \times 3 = 60$  halve breinen = **30 breinen** (15 (██████████) 15 WT).

n-needed =  $2 * ((Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta}) * SD \ 0.2 / \text{diff } 0.25)^2 = 10$

Nat/droog gewicht: 3 breinen x genotype (██████████ en WT) x 3 leeftijden ( $\sim 1$ ,  $\sim 4$  en  $\sim 7$  maanden):  $3 \times 2 \times 3 = 18$  breinen (9 (██████████) en 9 WT).

n-needed =  $2 * ((Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta}) * SD \ 0.1 / \text{diff } 0.25)^2 = 3$

(██████████): 9 breinen (zie boven) x genotype (██████████ en WT) x 3 leeftijden ( $\sim 1$ ,  $\sim 4$  en  $\sim 7$  maanden):  $9 \times 2 \times 3 = 54$  breinen (27 (██████████) 27 WT).

n-needed =  $2 * ((Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta}) * SD \ 0.26 / \text{diff } 0.35)^2 = 9$

### **Punt D1: (██████████) model van (██████████).**

Gebruik van (██████████) en WT muizen, P0-P3, van beide geslachten, geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

(██████████): totaal 18 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren  $\rightarrow$  9 kleuringen (9 plakjes); 4 tijdstippen (1, 5, 14 and 21 dagen na behandeling); 2 condities: (██████████); 2 genotypen (WT, (██████████) N=3; 3 experimenten:

$\rightarrow$  4 tijdstippen x 9 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 648 secties/genotype ; 2 secties per well; 324 wells; = **18** x 24-well platen per genotype

$\rightarrow$  18 platen x 2 genotypen (WT, (██████████) = 36 x 24-well platen totaal

WB/ELISA: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 4 tijdstippen (1, 5, 14 en 21 dagen na behandeling); 2 condities: (██████████); 2 genotypen (WT, (██████████) N=3, 3 experimenten:

$\rightarrow$  4 tijdstippen x 5 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 240 kleuringen/genotype 240 =  $20 * 12$  wells platen nodig (equivalent aan ongeveer **40** 24 wells platen) per genotype

$\rightarrow$  40 24 wells platen x 2 genotypen (WT, (██████████) = 80 x 24-well platen totaal

(██████████): 4 tijdstippen (1, 5, 14 en 21 dagen na behandeling); 2 condities: (██████████) versus (██████████) 2 genotypen (WT, (██████████) N=3; 2 experimenten:

$\rightarrow$  4 tijdstippen x N=3 x 2 experimenten x 2 condities/genotype = 48 samples/genotype ; 1 sample kost 10 cm plaat is equivalent aan  $\sim 36$  x 24 wells platen/genotype

$\rightarrow$  **1728** x 24 well plates x 2 genotypen (WT, (██████████) = 3456 x 24-well plates totaal

### **Voor alle hierboven genoemde experimenten:**

Totaal minstens 1786 x24-well platen, totaal 42864 wells / genotype

50.000 cellen/well (passage P2).

Totaal aantal cellen is  $42864 \times 50000 = 2143,2 \times 10^6$  cellen/per genotype

1 muis pup = ca.  $3.5 \times 10^6$  cellen

**613 pups nodig per genotype** = 613 WT + 613 homozygote [redacted] + 613 heterozygote pups + 88 moeders.

P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca.  $24.5 \times 10^6$  cellen dus 88 nestjes per genotype nodig voor alle experimenten. De fok voor null/null ([redacted]) is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted]) x null/null ([redacted]). Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ([redacted]) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.

### Punt D2: [redacted] in vivo

Gebruik van mannelijke dieren of beide geslachten afhankelijk van de experiment; ~4 maanden oude dieren; cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.

**Isolatie van [redacted] door middel van [redacted]**; ongeveer 50 cellen kunnen geïsoleerd worden uit een 6um-dik plakje, ongeveer 20 plakjes kunnen gesneden worden uit een brein; 3000 cellen (dus 3 hele breinen) noodzakelijk per sample voor [redacted] (n=1 bepaling).

3 experimenten x 2 genotype ([redacted] en WT) x 2 tijdstip (5 en 21 dagen na behandeling) x 4 behandeling ([redacted]). **24 dieren per genotype**

[redacted] karakterisatie inclusief extra tijdstippen: 4 breinen (1 helft [redacted] en 1 helft [redacted] x 2 genotype ([redacted] en WT) x 5 tijdstip (1, 5, 14, 21 en ~40 dagen na behandeling) x 4 behandeling ([redacted])

[redacted] **80** dieren per genotype

$n\text{-needed} = 2 * ((\alpha/2 + Z\beta) * SD \ 0.05 / \text{diff } 0.1)^2 = 4$  **voor validatie**

## B. De dieren

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

Muis, *mus musculus*; Wild type: C57Bl/6J en Homozygote [redacted] [redacted] [redacted]  
Beide stammen worden gefokt in het proefdiercentrum. Voor uitname pups op E18 worden de pups via hysterectomie bij de moeder uitgenomen. De moeder wordt na de hysterectomie onder anesthesie onmiddellijk gedood. Pups (P0-P2) worden spontaan geboren.

Tabel 2: berekening aantallen dieren

experiment	soort	sexe	~leeftijd	aantal
A1	[redacted]	beide	perinataal	16
	wt	beide	perinataal	16
A2	[redacted]	Man*	P0, P14, P42, P90, P120, P196, HEP	180
	wt	man*	P0, P14, P42, P90, P120, P196, HEP	180
A3	wt	beide	E18	16
	[redacted]	beide	E18	16
			Moederdier voor A1 & A3	10
A4	[redacted]	beide	5-6 maanden	240



	wt	beide	5-6 maanden	240
B	█	beide	P0-P3	21
	█	beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C1	█	beide	P0-P3	21
	█	beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C2	█	beide	1, 4 en 7 mnd	51
	wt	beide	1, 4 en 7 mnd	51
D1	█	beide	P0-P3	613
	█	beide	P0-P3	613
	wt	beide	P0-P3	613
D2	█	beide	4 mnd – 4 mnd +40dagen maximaal	102
	wt	beide	4 mnd-4 mnd +40dagen maximaal	102
			<b>totaal:</b>	<b>3185</b>

Totaal aantal dieren voor deze bijlagen: 3185 dieren

\*)

Door verschillen in █ is statistische analyse van deze experimenten ondoenlijk als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons inziens noodzakelijk.

### 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:

Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan lymfoblasten (gekweekte wittebloedcellen) van █ patiënten. Wij hebben

gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met fibroblasten van patiënten (gekweekte huidcellen). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. ■■■ is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van ■■■ patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (m.n. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

#### **Vermindering:**

De groepsgrootte is statistisch bepaald of gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die ex-vivo nodig is voor de analyses. Waar mogelijk worden breintjes gedeeld voor meerdere parameters.

#### **Verfijning**

Het betreft bijna uitsluitend onderzoek ex-vivo omdat we instaat zijn verfijnd onderzoek uit te voeren m.b.v. ■■■ kweken. We hebben in onze groep veel ervaring met intracerebrale injecties in het kader van de ontwikkeling van ■■■

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.

Het neurologisch fenotype van muizen met ■■■ uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren gemakkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

## **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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

## **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.

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Indien nodig worden mannelijke muizen solitair gehuisvest om onderling vechten te voorkomen.

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Adequate anesthesie en perioperatieve pijnbestrijding zal worden toegepast bij bv intracraniële injecties en zal in het werkprotocol worden afgestemd met de IvD.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Kenmerken van ■■■ ziekte in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water); gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren.

Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.

De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

### 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.

De volgende criteria worden gehanteerd: 15% gewichtverlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

~ 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.

•

- Intracraniale injecties onder anesthesie: licht tot maximaal matig
- Muis met fenotype (licht of matig, dit wordt achteraf bepaald en is nu als maximaal matig weergegeven) of toepassen HEP i.v.m. progressie van aangetast fenotype: matig (om ernstig te voorkomen)
- Uitname hersenen van pups na doden : licht

**Tabel 3: aantallen dieren en inschatting maximaal ondervonden ongerief**

Experiment	Licht	Matig
A1	32	
A2	280	80*
A3	42	
A4		480*
B	63	
C1	63	
C2	51	51*
D1	1839	
D2		204*

\* Dit betreft muizen met ongerief als gevolg van behandeling en/of fenotype.

Het cumulatieve ongerief is licht voor 2370 muizen (~ 74%).

Het cumulatieve ongerief is matig voor 815 muizen (~ 26%).

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het isoleren van de verschillende celtypen uit de breintjes.

Decapitatie wordt toegepast indien de pups te jong zijn om cervicale dislocatie toe te passen. Er is geen andere manier mogelijk om de jonge pups te doden waarbij hun hersenen intact blijven, hun schedel is erg kwetsbaar (bij cervicale dislocatie zullen de hersenen beschadigen). Deze manier van doden is noodzakelijk voor het verdere weefselonderzoek en is ook in eerdere vergunde aanvragen toegekend.

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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
4	Behandeling van <input type="text"/> in muizen met <input type="text"/>

*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.

pathologie is aanwezig in  de hersenen, maar varieert in ernst in de diverse fenotypen. Eerder onderzoek heeft aangetoond, dat de  niet goed functioneren door mutaties in de  en verantwoordelijk zijn voor de  pathologie. Onderzoek in muismodellen heeft laten zien dat

Op dit moment hebben we met muismodel  een model dat de humane ziekte klinisch goed weergeeft. Eerste experimenten in ons lab hebben aangetoond dat we ook in staat zijn om in dat model de . Daarnaast hebben we de  die de mogelijkheid biedt om een  te maken.

maken. De patiënt

Naast het meer fundamentele onderzoek beschreven in bijlagen 1 – 3 zal dit onderzoek zich dus richten op de behandeling van  met behulp van

Er zal gebruik gemaakt worden van de [redacted], verder te noemen [redacted] mutante stam, wanneer resultaten van de resultaten uit bijlage 1- 3 daar aanleiding toe geven).

Gezonde [redacted] uit controle muizen (C57BL/6J) of [redacted] worden ingespoten om zodoende te [redacted].

De effectiviteit van de behandeling wordt gemeten door het verbeterde motorisch gedrag te meten op volwassen leeftijd. Daarnaast zullen de dieren op verschillende tijdstippen [redacted] worden geëuthanaseerd. De hersenen zullen deels vers verzameld worden voor de analyse van [redacted] en [redacted], maar deels ook geperfundeed voor ex-vivo onderzoek [redacted].

Daarnaast kan [redacted] therapie van [redacted] invloed hebben op [redacted] en onderdeel zijn van behandeling. Tenslotte hebben recente onderzoeken aangetoond dat een [redacted] kan bijdragen aan slecht herstel van de [redacted] en dat [redacted] nieuwe perspectieven biedt voor hersenaandoeningen.

Bekende toxische [redacted] patiënten, als ook nieuwe gegevens over [redacted] uit onderzoeken beschreven in bijlagen 1 - 3, worden [redacted] te verbeteren. Ook zullen de effecten van [redacted] in vivo, [redacted], worden getest. F [redacted] De dieren worden geanalyseerd zoals hierboven beschreven.

#### **Fenotype in de gebruikte dieren in vergelijking met de humane patiënt:**

Bij mensen veroorzaken homozygote mutaties in [redacted] (autosomaal recessief overervend) een progressieve aandoening van de [redacted]. Menselijke dragers (ouders, eventuele drager-familieleden) hebben geen verschijnselen. Alleen personen die twee mutaties hebben, krijgen de ziekte. [redacted] leidt vooral tot een verlies van motorische vaardigheden (vooral stoornis van de coördinatie = ataxie). De cognitieve vaardigheden zijn relatief gespaard. [redacted] leidt tot vroegtijdig overlijden, vaak na een periode van coma. Het ongerief bij [redacted] patiënten is gering; de motorische afwijkingen geven geen pijn maar de belasting is zeer ernstig door de beperkingen. Als de ataxie op jonge leeftijd ontstaat, ervaren de kinderen hun motoriek als "normaal". Bijna alle patiënten hebben epilepsie, soms een status epilepticus. Aangezien epileptische aanvallen bij [redacted] vrijwel altijd met verlies van bewustzijn gepaard gaan, merken patiënten over het algemeen niets van hun aanvallen.

- Muizen met één mutatie zullen, net als menselijke dragers, naar verwachting geen enkel ongerief ondervinden. Voor [redacted] dat muizen die twee mutaties hebben vooral motorisch ongerief ondervinden.
- Bij de homozygoten [redacted] muizen beginnen de motorische veranderingen pas na 4 maanden. Op dat moment is het ongerief gering. De dieren verzorgen zichzelf goed, eten normaal en planten zich voort. Op 5 maanden, worden de dieren wel uit de fok gehaald.
- Dieren worden vanaf 4 maanden extra gemonitord. Extra monitoren houdt in dat de dieren wekelijks worden 1) gewogen; 2) onderzocht op verzorging, huid en staart; 3) motorische afwijkingen (ataxie, epilepsie, grip); 4) reflex testen (oog, teen-spreid, grip). Dit wordt bijgehouden in een logboek. Bij belangrijke gewichtsafname (meer dan 15% van eigen lichaamsgewicht in 2 weken), verlaagde voedselinname of verminderde verzorging zal het dier meteen worden geëuthanaseerd (=humane eindpunt) waardoor ernstig ongerief wordt voorkomen.

**Uitkomst parameters: spierzwakte** (bepaald door motorische testen), gewichtsbepaling, ex-vivo onderzoek van de hersenen.

#### **Referenties**

1. [redacted]

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.

De dieren worden intracranieel ingespoten met [redacted]. De [redacted] behandeling door het toedienen (oraal, sc of ip) van [redacted] hangt van de factoren die komen uit het onderzoek beschreven in bijlagen 1-3 of

ander onderzoek.

De dosis en de frequentie hangen en de toedieningsroute is afhankelijk van het [REDACTED] (geselecteerd uit bijlage 2 of de literatuur) met een wekelijkse behandeling met een duur van 2 – 11 maanden. Dit zal per werkprotocol met de IvD worden afgestemd.

**Tabel 1: overzicht handelingen**

A. handeling	B: Frequentie	C. duur
Intracraniale injectie	eenmalig	~10 min.
[REDACTED] behandeling, p.o. s.c of i.v., i.p.	1 x dag of 1 x week	Max 11 mnd
[REDACTED]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[REDACTED]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[REDACTED]	Max 4 maal	Max 10 min per test
Doden	1 maal	~1 min
[REDACTED] fenotype		~2-7 maanden

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

Door de multidisciplinaire aanpak van dit project kan met een minimale fok (en dus zo min mogelijk surplus dieren) het onderzoek worden uitgevoerd. Op basis van de experimenten beschreven in bijlagen 1 – 3 kan een goede keuze worden gemaakt voor het optimale model en de optimale keuze van [REDACTED]

Hoofd parameter is de histopathologie om aan te tonen dat de [REDACTED].

Verwachte uitkomst: Wij verwachten dat de [REDACTED] een verminderd fenotype [REDACTED]

[REDACTED] muis, aangezien eerdere studies in andere laboratoria hebben aangetoond dat [REDACTED] herstel kunnen geven in muismodellen [REDACTED].

Gebruik per jaar per lijn

**Testen van [REDACTED]**

[REDACTED] BL6 muizen:

- ⇒ Deze [REDACTED] muizen worden gebruikt omdat zij tijdens het leven geleidelijk aan een [REDACTED] fenotype gaan vertonen en zo de mogelijkheid geven om het effect van de behandeling te volgen.
- ⇒ Behandelde dieren worden op 3 leeftijden bestudeerd: ~2 maanden (pre-klinisch symptomatisch); ~5 maanden (klinisch symptomatisch); ~7-12 maanden (evident klinisch symptomatisch). Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- ⇒ 2 behandelgroepen: vehicle + compound, deze compounds zijn geselecteerd uit eerder onderzoek of nieuwe resultaten uit bijlage 1-3. De compound zal als zuivere stof in een [REDACTED] vehicle worden toegediend.
- ⇒ Het te isoleren materiaal voor verdere analyse dient verschillend verzameld te zijn: vers en na perfusie (onder anesthesie)
- ⇒ Berekening van aantal dieren:  
Gebaseerd op eerdere studies is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:  
Control (saline): gemiddelde gevonden waarde 0.27 ([REDACTED])  
Gewenst effect na behandeling:  $\leq 0.19$ , st.dev.: 0.05 en desired power: 0.8
- ⇒ 7 dieren per groep
- ⇒ Aantal dieren: 3 leeftijden x 2 behandelgroepen x 2 weefselgroepen x 7 dieren/groep = 84 dieren per experiment
- ⇒ Ivm met opvolgen van dieren achten we dat max 2 compounds per jaar getest kunnen worden:  $84 \times 2 = 168$  dieren
- ⇒ Aantal interventies: 2 interventies per jaar en maximaal 10 interventies per 5 jaar.

**Testen van [REDACTED] in combinatie met [REDACTED]:**

- ⇒ Behandelde dieren worden met de volgende therapievormen behandeld: [REDACTED]
- ⇒ Berekening van aantal dieren:  
 Gebaseerd op eerdere studies ([REDACTED]) waarbij ook is gekeken naar verbeterd fenotype van muizen met een [REDACTED] na behandeling [REDACTED].  
 Poweranalyse ([REDACTED]):  
 Control (saline): gemiddelde overleving (toepassen humaan eindpunt) is 135 dagen,  
 Behandeld: gemiddelde overleving (toepassen humaan eindpunt) is 171 dagen  
 St.dev.: 40, desired power: 0.8
- ⇒ 20 dieren per groep, maar omdat dat in de praktijk niet haalbaar is worden experimenten om praktische redenen sequentieel uitgevoerd op basis van nesten.
- ⇒ Aantal dieren: 3 leeftijden (~2 maanden, ~5 maanden, ~7-12 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 dieren per groep = 120 dieren
- ⇒ Om logistieke redenen worden er niet meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd. Maximaal aantal pups dat er per maand geïnjecteerd wordt: 8 (nestjes per maand) \* 6 (± dieren per nestje) = 48 dieren
- ⇒ Voor iedere conditie (binnen 1 experiment) wordt 1 nestje gebruikt; het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. De resterende dieren worden verzameld voor biobanking.
- ⇒ Per jaar wordt er maximaal getest: 48 (dieren per maand) \* 12 (maanden per jaar) = 576 pups
- ⇒ Berekening van aantal interventies per jaar: 576 pups / 120 (dieren per experiment) = 4,8
- ⇒ Aantal interventies: 4-5 interventies per jaar en 20-25 interventies per 5 jaar.

### Genereren van celpopulaties:

Genereren van [REDACTED]:

C57BL/6J muizen:

- ⇒ De gezonde [REDACTED] worden uit E18 C57BL/6J pups geïsoleerd. Voor de isolatie van [REDACTED] worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.
- ⇒ Onze experimenten hebben aangetoond dat we uit een E18 nestje (gemiddeld 6 pups) ~  $2,5 * 10^7$  [REDACTED] kunnen isoleren. Om genoeg [REDACTED] voor injectie van maximaal 12 dieren (op 1 dag) hebben we daarom naar verwachting 2 E18 nestjes of 12 C57BL/6J pups nodig.
- ⇒ In 1/3 deel van de experimenten per jaar worden gezonde muis [REDACTED] afkomstig van E18 embryo's toegediend.
- ⇒ Aantal dieren: 576 (pups per jaar) / 12 (dieren [REDACTED]) \* 1/3 ([REDACTED]) \* 12 (pups) = 192 E18 pups per jaar.

Genereren van [REDACTED]:

[REDACTED] BL6 muizen:

- ⇒ [REDACTED]
- ⇒ De parameters ([REDACTED]) worden op twee leeftijden: 2 maanden ([REDACTED]) en 4 maanden ([REDACTED]) geanalyseerd;
- ⇒ Voor iedere leeftijd injecteren we 3 dieren. Ondanks dat 1 [REDACTED] dier volstaat, houden we rekening met experimentele variatie: [REDACTED]
- ⇒ [REDACTED] voor de injectie van 30 dieren.
- ⇒ Per jaar worden maximaal 576 dieren getransplanteerd; 2/3 vd experimenten worden [REDACTED].  $576 * 2/3 / 30 = 12,8$  [REDACTED] per jaar
- ⇒ Aantallen: 12,8 batches \* 2 (leeftijden) \* 3 (dieren/leeftijd) = 76,8 (77) dieren per jaar



## B. De dieren

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

**Diersoort:** muis (*Mus musculus*) en genetisch gemodificeerde muizen.

**Herkomst:** alle dieren worden in het proefdiercentrum gefokt onder SPF condities.

De homozygote mutanten worden gegenereerd met de [redacted] [redacted] [redacted] fok.

Er worden [redacted] gebaseerd op resultaten uit bijlagen 1 - 3), [redacted] en WT C57BL/6J muizen gebruikt. Wanneer [redacted] worden [redacted] zullen [redacted] op een [redacted] achtergrond worden gebruikt omdat anders de [redacted]. De [redacted] mutaties zijn aanwezig in [redacted] en veroorzaken in muizen een vergelijkbaar klinisch ziektebeeld, [redacted]. C57BL/6J muizen worden gebruikt om [redacted]. [redacted] muizen worden gebruikt om de [redacted].

De behandeling van de [redacted] zal vanaf P0 starten. Het precieze tijdstip van [redacted] behandeling hangt deels af van de factoren die uit het onderzoek beschreven in bijlages 1-3 komen. De dieren vertonen pas vanaf 5 maanden klinische afwijkingen.

C57BL/6J muizen worden op E18 gebruikt omdat dan [redacted].

Alle pups in het nestje worden gebruikt, aangezien op E18-P0 de sexe lastig is te bepalen.

### Tabel 2: Aantallen en levensstadia

Aantallen en levensstadia per jaar:

Diersoort	Muis	Muis	Muis	Muis
Aantal	168	576	192 + 32 moeders	77
Stam	[redacted] BL6	[redacted] RAG2null BL6	C57BL/6J	[redacted] BL6
Geslacht	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen
Leeftijden (maanden)	~2 m, 5 m, 7-12 m	~2 m, 5 m, 7-12 m	E18, ~8 tot 20 weken voor moeders	~2 m, 4 m

- Drachtige muizen waarvan de pups (beide sexen) op E18 onder terminale anesthesie en hysterectomie worden geboren.
- De gegenereerde nestjes worden geïnjecteerd met [redacted] afkomstig van 1) geïsoleerd uit E18 C57BL/6J pups, 2) gegenereerd via [redacted] of 3) gegenereerd [redacted].
- Per experiment worden de muizen na 2 maanden (pre-klinisch symptomatisch), 5 maanden (start klinisch symptomatisch) of 12 maanden (evident klinisch symptomatisch) geëuthanaseerd. Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- Het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. Wanneer niet alle dieren nodig zijn, worden de resterende dieren verzameld voor biobanking.
- Experimentele variaties kunnen ontstaan doordat [redacted]. [redacted] Met deze variaties is al rekening gehouden in de bovenstaande berekeningen van aantallen.
- Om logistische redenen is het niet realistisch dat er meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd worden.

Totaal aantal dieren:  $1045 \times 5 \text{ jaar} = 5225$  muizen.

### 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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging:

Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan lymfoblasten (gekweekte wittebloedcellen) van █████ patiënten. Wij hebben gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met fibroblasten van patiënten (gekweekte huidcellen). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. █████ is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van █████ patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast kunnen wij niet vrijelijk therapeutica uitproberen bij levende patiënten. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (mn. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

#### Vermindering:

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Van het uitgenomen materiaal (hersenen) wordt alles gebruikt voor verdere ex-vivo analyse. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

#### Verfijning:

Er wordt op basis van de resultaten uit bijlage 1 – 3 een model gekozen met milde ziekte kenmerken.

Weliswaar duren de experimenten dan langer voordat effecten kunnen worden waargenomen, maar wordt matig tot ernstig lijden voorkomen.

Daar het verloop van de ziekte ons bekend is wordt tijdig voer op de bodem van de kooi gelegd en worden de experimenten beëindigd op het moment dat we effecten op █████ (histopathologie) mogen verwachten. Door de █████ aanpak beschreven in de 4 bijlagen kan een zeer efficiënte fok worden opgezet en worden grote aantallen surplus dieren van niet-gewenste genotypes voorkomen.

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.

Er is gekozen voor een mild model, er wordt op tijd zacht voer onder in de kooi gelegd. In de groep waar effecten na > 5 maanden geëvalueerd gaan worden, kunnen ernstiger symptomen van █████ worden waargenomen (zoals > 15% gewichtsverlies, ernstige neurologische symptomen zoals verlamming) zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er wordt samen met de IvD een score tabel opgesteld voor een humaan eindpunt waardoor ernstig ongerief voorkomen kan worden. De genetisch gemodificeerde dieren, hun controles en het gebruikte beddingmateriaal wordt conform de wet verbrand zodat niets in het milieu terecht kan komen.

---

## 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.

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn

## 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.

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. De mannetjes worden indien nodig solitair gehuisvest, omdat bekend is dat deze kunnen vechten bij groepshuisvesting.

### 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.

Het moederdier zal onder terminale anesthesie een hysterectomie ondergaan.

Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk ( [REDACTED] )  
[REDACTED] zullen onder hypothermie worden uitgevoerd. Pups worden na de behandeling bij fostermoeders gelegd.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Kenmerken van wittestofziekte in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water); gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het verdwijnen van de witte stof uit de hersenen in de dieren.

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

Uit de bestaande genetisch gemodificeerde muizen wordt een mild model gekozen en wordt er zacht voer op de bodem van de kooi gelegd. De uitgevoerde behandelingen ( ) gebeurt onder pijnbestrijding. Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk ( ), daarom wordt hypothermie gebruikt door de pups in met ijs gekoelde (klei vervaardigde) mallen te plaatsen. Direct contact met ijs wordt vermeden om bevriezing van de huid te voorkomen.

### 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.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies). **HEP is als volgt gedefinieerd: 15% gewicht verlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies.**

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

10%

### K. Classificatie van ongerief

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

Matig door de intracraniale behandeling onder hypothermie, licht indien een behandeling effectief lijkt te zijn, matig indien een humaan eindpunt moet worden toegepast. Er worden geen complicaties verwacht van doordat deze zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is dus niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken ongerief veroorzaken.

### Tabel 3: ongerief per handeling

A. handeling	B. kwalificatie <i>terminaal/licht/matig/ernstig</i>	C. duur v.h. ongerief
Uithalen van baarmoeder	Terminaal	~2 min
	Matig (onder hypothermie bij jonge pups)	~ 10 min
behandeling, p.o. s.c of i.v., i.p.	Matig	~ 30 sec (dagelijks tot wekelijks)
	Licht	~4x 10 min
	Licht	~4x 10 min
	Licht	~4x 10 min
Doden	Licht of terminaal (perfusie of onder anesthesie moederdieren)	~ 1 min
fenotype	Max. Matig	~2-7 maanden

Het cumulatieve ongerief is 'matig' bij ~79% van de dieren.  
Het cumulatieve ongerief is 'licht' bij ~18% van de dieren.  
Het cumulatieve ongerief is 'terminaal' bij ~3% van de dieren (zie Tab. 1).

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Weefseluitname (hersenen) voor verdere ex-vivo analyse.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[redacted] 20172804  
**Bijlagen**

1

Datum 19 september 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 31 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "[redacted] kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën" met aanvraagnummer AVD1140020172804. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij u vragen gesteld over de mobiliteitstesten, het niet toepassen van pijnbestrijding, de individuele huisvesting, het ongerief, het benodigd aantal dieren en de humane eindpunten. Met uw antwoord heeft u nieuwe documenten meegestuurd. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

### **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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld. In uw aanvraag geeft u aan verschillende mobiliteitstesten zoals grip strength measure, balance beam and foot print test uit te voeren. U laat in uw aanvraag ruimte over voor het uitvoeren van andere mobiliteitstesten. Er mogen echter geen handelingen worden uitgevoerd die niet in de aanvraag staan beschreven. Om deze reden hebben wij een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd.

U kunt met uw project "[redacted] in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze

termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

**Datum:**  
19 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[REDACTED] 20172804

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC [REDACTED] toegevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 juni 2017. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).



Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

**Datum:**  
19 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[redacted] 20172804





# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën" met aanvraagnummer 20172804, volgens advies van Dierexperimentencommissie

Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 juli 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 juli 2017, ontvangen op 31 juli 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 augustus 2017

Aanvraagnummer:  
AVD1140020172804

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1. Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] gericht op o.a verbeterde [redacted]</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	592	100% Matig	
<b>3.4.4.2. Behandeling van [redacted] in muizen door [redacted] routes</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	3.080	80% Matig 20% Licht	
<b>3.4.4.3. Verbetering van [redacted] ex-vivo analyses na [redacted] uit muizen met [redacted] in celweek</b>				Totaal aantal dieren: 3185. Aantal embryo's (E18): 32
	Muizen (Mus musculus) /	3.185	26% Matig 74% Licht	
<b>3.4.4.4. Behandeling van [redacted] n muizen met [redacted]</b>				Totaal aantal dieren: 5225. Aantal embryo's (E18):960
	Muizen (Mus musculus) /	5.225	3% Terminal  79% Matig 18% Licht	

**Aanvraagnummer;**

20172804

**Voorwaarden**

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Er mogen geen andere dan de drie in de aanvraag genoemde mobiliteitstesten worden uitgevoerd.



Aanvraagnummer:

20172804

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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



**Aanvraagnummer:**

20172804

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.