

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven op Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

E-mail: [redacted] telefoon: [redacted] / fax: [redacted]

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Identificeren van natuurlijke herstelmechanismen na schade.

1.2. **studienummer:** 032.12271/01.01

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):**

1. 2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [redacted]

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [redacted]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [redacted], [redacted] (beiden ex art. 12). [redacted] (ex art. 9), en stagiair [redacted] (studente neuroscience; proefdierkunde cursus afgerond)

Externe samenwerking (indien van toepassing): *ex vivo* werk wordt uitgevoerd bij TNO [redacted] (Toll-like receptoren: [redacted]), bij TNO [redacted] (proteoom analyse: [redacted] en [redacted]) en bij [redacted] Amsterdam (histologie neurogenese: [redacted])

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: september 2007

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail: [redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 1,5 jaar

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	32	3	6	32	1	1	01	01	4	4	2	1
2	1	32	3	6	32	1	1	01	11	4	4	3	1
3	1	32	3	6	32	1	1	01	01	4	4	4	1
4	1	32	3	2 (reserve)	32	1	1	01	11	4	4	2	1

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

Achtergrond informatie:

Het optreden van schade aan het centrale zenuwstelsel (CNS) is een natuurlijk, dagelijks proces. Evenzo is herstel van die schade een noodzakelijk en natuurlijk fenomeen waarbij ontsporing van dat herstel waarschijnlijk de oorzaak is van een aantal neurodegeneratieve ziekten.

Uit recente bevindingen uit eerdere studies met marmosetapen en humaan donor materiaal (DEC no 1287 en DEC no 2148) blijkt dat er tijdens het ontstaan van schade specifieke eiwitten en peptiden in de hersenen gevormd worden, ongeacht de aard van de oorzaak van die schade. Deze eiwitten en peptiden spelen vermoedelijk een rol bij herstelfuncties en hebben daarmee een beschermende werking.

Deze eiwitten, waaronder stathmine en alpha B-crystalline, zullen gaan dienen als markers binnen een translationeel model voor neuroprotectie. In de toekomst zouden deze eiwitten zelfs een bijdrage kunnen leveren in het verbeteren van de therapeutische bescherming van het CNS, omdat met deze eiwitten de lichaamseigen herstelfuncties aangesproken kunnen worden.

- Om de specifieke eiwitten in kaart te brengen is het van belang om een goed protocol te hebben waarin enerzijds bij de ene groep schade wordt aangebracht om herstelfuncties te activeren (de MPTP marmoset) en anderzijds bij een andere groep herstelfuncties worden afgeremd (het post traumatic stress disorder (PTSD) protocol). Het gaat er niet om beide ziektebeelden met elkaar te vergelijken maar om de functionele gedragsverstoringen als gevolg van schade te correleren aan veranderende processen in het brein.
- Voor het bepalen van CNS functionaliteit als gevolg van schade en herstel zal het gedrag en de hersenactiviteit bestudeerd worden. Daarvoor is het van belang te beschikken over geschikte markers en uitleessystemen binnen het experimentele onderzoek.

Modellen die voldoen aan beide eisen hebben we reeds ontwikkeld in de marmosetaap (DECno 1287, 2148).

Vraagstelling onderzoeksplan:

Dit project beoogt de identificatie van eiwitten, op basis van reeds ontwikkelde methodes, die centraal staan in het bepalen van de balans tussen schade en herstel in het CNS waaronder stathmine en alfa B crystalline. Via biochemische technieken zal het eiwit-profiel in de hersenen in hierboven beschreven beide situaties worden vergeleken in relatie tot veranderingen in functionele aspecten zoals gedrag en histologie.

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier

Degeneratie van het CNS kan optreden door neurodegeneratieve ziekten waaronder Parkinson (PD), door stress gerelateerde aandoeningen waaronder PTSD, en door inwerking van bepaalde schadelijke chemicaliën. Met de vergrijzing in de Westerse wereld vormen neurodegeneratieve ziekten een in omvang toenemend probleem, met een enorme negatieve impact op de kwaliteit van leven van de patiënt. Stress gerelateerde neurodegeneratie vormt onder andere een probleem in vredesoperaties uitgevoerd door het Ministerie van Defensie. Neurodegeneratie door blootstelling aan chemicaliën, bijvoorbeeld langdurige blootstelling aan oplosmiddelen, is vooral herkend door de relatie met bepaalde beroepsgroepen. Het tegengaan van degeneratie van het CNS, door 'neuroprotectie', is één van de belangrijkste onderzoeksgebieden in neuro-research.

Neuroprotectie beoogt het voorkómen of verminderen van de schadelijke gevolgen van toxische stoffen of van neurodegeneratieve processen voor het functioneren van neuronen. Dat functioneren vertaalt zich uiteindelijk in functies van cognitie en gedrag.

De opgedane kennis uit het in deze aanvraag beschreven onderzoek zal ook toepasbaar zijn op andere neurodegeneratieve processen dan alleen PD of PTSD. Het bestrijden van neurodegeneratie door het stimuleren van de lichaamseigen neuroprotectie zal op termijn de gezondheid van mens en dier ten goede komen.

6.a.2 Economisch belang

Het economisch belang is onschatbaar. Door de veroudering van de bevolking in de Westerse wereld neemt de persoonlijke en maatschappelijke last van aandoeningen van het CNS snel toe. In schril contrast met dit gegeven staat het feit dat aan vrijwel alle van deze CNS ziekten nog betrekkelijk weinig te doen is. Hoewel breed wordt erkend dat ze alles te maken hebben met een verstoorde balans in het CNS tussen schade en herstel, zijn er op dit moment geen adequate middelen tegen neurodegeneratie, noch pharmaca, noch therapie anderszins.

6.a.3 Milieu belang

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

6.b Wetenschappelijk belang:

Het blijkt dat er tijdens het ontstaan van CNS-schade specifieke eiwitten en peptiden in de hersenen gevormd worden, ongeacht de aard van de oorzaak van die schade. Deze eiwitten en peptiden spelen kennelijk een generieke rol bij herstelfuncties en ze hebben daarmee potentieel een beschermende werking. Het in kaart brengen van de natuurlijke herstelprocessen is een belangrijke stap om behandelingen te ontwikkelen voor het voorkomen of beperken van neurodegeneratieve schade van diverse aard (psychisch, chemisch of zelfs mechanisch). Het hier beschreven onderzoek richt zich op het vinden van markers die relevant zijn voor neuroprotectie waardoor tevens de reeds aanwezige modellen voor de ziekte van Parkinson en PTSD verbeterd worden.

Om de invloed van specifieke eiwitten en peptiden op herstelmechanismen goed te kunnen bestuderen en vast te kunnen stellen is het van belang om veranderingen in functionaliteit goed en éénduidig te kunnen vaststellen op verscheidene niveaus: 1) gedrag en cognitie 2) CNS-weefsel en 3) biochemisch en moleculair. Daarvoor is het noodzakelijk om over een goed diermodel te beschikken waarin, enerzijds, neurodegeneratieve schade kan worden aangebracht om herstelfuncties te activeren en, anderzijds, herstelfuncties kunnen worden afgeremd of gestimuleerd.

Nieuwe eiwitmarkers die uit de analyse voort komen zullen direct verder onderzocht worden met gebruikmaking van *in vitro* modellen met menselijke neurale cellen, en in experimentele modellen voor neurale schade in muis, rat en marmosetaap. Het is de bedoeling om de informatie te gebruiken als startpunt voor o.a. *in vitro* studies met gekweekte neurale cellen. Het gebruik van de marmoset in deze is dus uitsluitend bedoeld om een cruciale stap in het proces te zetten (alleen mogelijk in marmosets), die moet leiden tot informatie. De informatie met betrekking tot stathmine in relatie tot herstelprocessen is cruciaal voor stroomlijning van de binnenkort te starten activiteiten binnen het TIPharma project rondom Toll-like receptoren en hun agonisten, waarin TNO specifiek de neuroprotectieve rol van de stathmine-Toll-like receptor 3 (TLR3) interactie zal onderzoeken. De informatie rondom alfa B-crystalline zal van groot belang zijn voor de nadere klinische ontwikkeling van alfa B-crystalline als therapeutisch eiwit, zoals door de TNO spin-out Delta Crystallon wordt bewerkt. Daarnaast zal de in deze studie opgebouwde kennis worden toegepast binnen een nieuw onderzoeksprogramma op gebied van PTSD waarin de translationele benadering centraal staat. Dit programma gaat in 2008 van start. In dat onderzoek zal het effect van farmacologische interventie binnen het stress model onderzocht worden, waarbij het doel is om de negatieve effecten van stress te voorkomen en zodoende hersenschade te voorkomen.

Zoals al eerder aangegeven staan twee eiwitten centraal in dit onderzoek nl. stathmine en alfa B-crystalline. In het onderzoek is het van groot belang deze referenties te hebben die binnen het te verwachten proteomics-profiel als ijkpunt kunnen dienen als daadwerkelijk neuroprotectieve marker-eiwitten. Zowel stathmine als alfa B-crystalline zijn dergelijke markers. Stathmine is een door oligodendrocyten en neuronen geproduceerd eiwit dat verhoogd tot expressie komt na schade of trauma. Op basis van *in vitro* studies met menselijke cellen uit de hersenen (astrocyten, microglia en oligodendrocyten) is vast komen te staan dat stathmine via binding aan TLR3 cellulaire activatie teweegbrengt die gepaard gaat met productie van een reeks aan neuroprotectieve en ontstekingsremmende mediators zoals cytokines, chemokines en groeifactoren. Experimenten bijvoorbeeld met plakjes menselijke cortex in kweek (slice cultures) hebben laten zien dat deze TLR3-gemedieerde activatie van astrocyten en microglia inderdaad leidt tot een significant verbeterde overleving van de

menselijke neuronen in deze slice cultures (Bsibsi *et al.*, 2006)¹. Zowel de functie van TLR3, als stathmine de agonist voor deze receptor zijn daarmee gekwalificeerd als neuroprotectief. Tevens hebben celkweek experimenten laten zien dat de reeks aan cytokines en chemokines die door stathmine in microglia wordt geïnduceerd zeer sterke gelijkenis vertoont met de reactie van deze zelfde cellen op alfa B-crystalline, een ander endogeen neuroprotectief eiwit in de zoogdier-hersenen. Dat alfa B-crystalline neuroprotectief werkt is recent uitvoerig gedocumenteerd in muizenstudies (Ousman *et al.*, 2007)²; het remt apoptose in neurale cellen en in muizen deficiënt voor alfa B-crystalline verloopt experimenteel geïnduceerde ontstekingschade (EAE) beduidend ernstiger dan in normale dieren. Ook studies *in vitro* met gebruikmaking van menselijke hersenen laten zien dat alfa B-crystalline zowel binnen neurale cellen als buiten cellen een beschermende werking heeft, en bijvoorbeeld TNF-geïnduceerde apoptose sterk remt. Zowel stathmine als alfa B-crystalline kunnen goed in marmoset-monsters worden gedetecteerd m.b.v. beschikbaren monoklonale antilichamen via western blotting, en ze vormen daarmee ideale markers voor identificatie van endogene neuroprotectieve eiwitprofielen.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld? Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Het betreft hier een intern gefinancierde studie welke is voorgelegd aan:

1. deskundigen binnen de BU Biologische en Chemische Bescherming ([redacted] , toxicoloog en pharmaceut, [redacted] , toxicoloog en apotheker, [redacted] , chemicus)
2. een commissie van TNO [redacted] die de voorstellen op inhoudelijk niveau en relevantie heeft beoordeeld.

Daarnaast is de wetenschappelijke kwaliteit beoordeeld door [redacted] van het [redacted] ([redacted]) Amsterdam, die gespecialiseerd is op het gebied van moleculaire mechanismen bij stress, en [redacted] psychiater verbonden aan het Centraal Militair Hospitaal, tevens PI van een 10 jarig onderzoekstraject op gebied van PTSD.

Dit project wordt tevens gesteund door de directies DenV en KvL en het management van de BU4 waar deze opdracht wordt uitgevoerd. Zij hebben allen dit plan positief beoordeeld. Bovendien wordt het eindresultaat van dit onderzoek beoordeeld vanuit de kaderstelling van de directies DenV en KvL ('kennislijn').

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):

- ☒ nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- ☒ (X)herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DEC nr.: Het isolatie protocol is eveneens eerder uitgevoerd in de studie met DEC-advies nr.: 1374 en 2148. Het marmoset MPTP model is al vaker uitgevoerd zie o.a. DEC-advies nr. 1287 en 1985.
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
wettelijke eis:
testrichtlijn:
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz. Verwijs, indien van toepassing, naar standaardstudieplan voor de uitwerking.

¹ Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer RWH, Meeuwse S, Ravid R and van Noort JM (2006) Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia*. 53:688-695.

² Ousman SS, Tomooka BH, Van Noort JM, Robinson WH, Sobel RA, Wawrousek EF, and Steinman L (2007) Protective and therapeutic role for alpha B-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*, advanced online publication 13 June 2007.

Alle dieren ondergaan, onafhankelijk van de testgroep waartoe zij behoren, dezelfde gedragstesten en biotechnische ingrepen voor het meten van effecten na behandeling (zie Tabel 1).

De studie bestaat uit drie groepen van 6 dieren. De studie zal opgedeeld worden in twee delen waarbij in deel I de helft van alle dieren uit iedere groep getest worden ($n=3$ / groep) en in deel II de andere helft (in totaal wordt het dus $n=6$ /groep).

1. Groep 1: controle groep. De dieren van de controle groep worden normaal volgens de standaard binnen TNO gehuisvest en dienen als controle groep voor de *ex vivo* parameters zoals histologie en biochemische bepalingen en voor het uitsluiten van tijdseffecten van de gedragstesten.
2. Groep 2: stress groep (zie DEC no. 2148). Deze dieren worden voor een periode van twee weken individueel geïsoleerd van de andere dieren. Halverwege de tweede week van de isolatieperiode worden deze dieren gedurende maximaal 10 minuten in een ander territorium geplaatst bij een dominant dier van hetzelfde geslacht. Hierna worden ze teruggeplaatst in de isolatiehuisvesting. Na de twee weken isolatie worden de dieren teruggebracht naar de normale verblijfsruimte. Dit protocol is opgezet en getest in de studie met DEC no. 2148.
3. Groep 3: Parkinson groep (zie o.a. DEC no1985). Bij deze dieren wordt de ziekte van Parkinson geïnduceerd met behulp van, afhankelijk van de mate van optredende symptomen, 5 subcutane injecties met MPTP (eerste twee injecties 2 mg/kg en de overige toedieningen 1 mg/kg; dosisvolume: 0.5 ml/kg LG). De injecties vinden plaats volgens Tabel 1 gedurende 2 weken. Na de voorlaatste toediening wordt besloten of de dieren een extra toediening nodig hebben op vrijdag of dat er helemaal gestopt wordt met de toedieningen. Indien nodig wordt bij enkele dieren op de laatste toedieningsdag 1,5 mg/kg toegediend in plaats van 1 mg/kg. Het komt namelijk voor dat de gevoeligheid voor MPTP iets verschilt. Op deze manier handhaven we een individueel injectieschema om overdosering te voorkomen (dus in totaal 6 tot 7,5 mg/kg MPTP). De toediening van MPTP vindt altijd plaats na het testen.

Vóór de isolatie periode en vóór de Parkinson inductie worden alle dieren getraind in de hand-oog coördinatie test en worden bij alle dieren onder isofluraan/O₂ anesthesie en een lokale pijnbestrijding van lidocaine op de huid, twee EEG elektroden op de schedel met 2 kleine chirurgische schroefjes geplaatst en gefixeerd met tandartsceement. Ook worden tegelijk twee EMG elektroden op de kinspier en de nekspier bevestigd voor het meten van de spierspanning. De EMG is van belang om rapid eye movement (REM) slaap van wakkerperiodes tijdens de slaap te kunnen onderscheiden. Deze EMG elektroden worden onder de huid door naar de andere twee EEG elektroden getunneld. Aan deze vier elektroden wordt een plugje bevestigd waarop tijdens de meting een transmitter kan worden 'geklikt' voor telemetrische meting van het EEG en EMG. Hierdoor kan de aap zich vrij bewegen zonder interactie met draden. De ontvanger voor het EEG en EMG signaal wordt onder de kooi bevestigd.

Na training van de hand-oog coördinatie taak en twee weken na het aanbrengen van de elektroden zal van het EEG/EMG een basiswaarde worden opgenomen tijdens slaap. Van de andere parameters worden ook basis waarden verzameld. Deze bestaan uit:

- Bloedmonster (20 µl) via de hielprik methode (~ bij mensen met de vingerprik) voor cortisol meting.
- Startle response: motor reactie van het dier op 20 geluidspulsjes (110 db, 10 KHz, duur 20 ms).
- Home cage activiteit welke automatisch 24 uur per dag wordt geregistreerd via bewegingsdetectoren.
- Locomotor behavior in de bungalow test waarbij de aap gedurende 20 min. zich vrij in deze opstelling kan verplaatsen (de activiteit wordt middels video tracking geregistreerd) (TNO WVS Q215-W-028).
- Hand-oog coördinatie. Hiervoor worden de dieren eerst getraind. De test bestaat uit 42 trials waarbij een beloning (spekjes) via een robotarm met een variabele snelheid wordt gepresenteerd. Het aantal correcte hits (pakken van spekjes) is een maat voor de hand-oog coördinatie (TNO WVS Q215-W-057).
- Klimtoren: deze bestaat uit een 2,3 meter hoge toren waarin op verschillende niveaus zitstokken zijn aangebracht die in afstand tot elkaar naar boven toeneemt. De aap is van nature gemotiveerd om naar boven te gaan. De mogelijkheid om te kunnen springen wordt echter moeilijker na bv Parkinson inductie. Het bereikte level en de tijd die hiervoor nodig is wordt gebruikt om de disability te meten. Deze methode wordt reeds toegepast in de studie met DEC no 1985 (na overleg met [REDACTED]).

- Meten van gevoeligheidsdrempel. Hiervoor worden de dieren in een koker, zoals ook gehanteerd wordt voor de startle meting, geplaatst op een grid vloer. Met kleine stapjes wordt de stroom (in microampère (μ amp)) op de grid vloer opgehoogd beginnend met 20 μ amp. De stroom welke wordt waargenomen door het dier -gemeten door het observeren van de reactie zoals het optillen van de voeten of onrustig gedrag- wordt meegenomen als de drempelwaarde voor de gevoeligheid. Dit wordt 3 x gedaan om de gemiddelde waarde te kunnen vaststellen per dier. Bij ratten ligt deze drempel rond de 60 μ amp. Het gaat hier om lage stroomwaarden. Als voorbeeld, op een liksensor aan een drinkpijpje, om te meten of een dier heeft gedronken, staat standaard een stroom van ca 10 μ amp.
- Observaties: klinische symptomen, angst en depressie gerelateerde symptomen en Parkinsonsymptomen. Deze observaties vinden plaats vanuit de 'home cage' (TNO [REDACTED]).
- De subcutane lichaamstemperatuur wordt niet-invasief gemeten met een scanner via een identificatie chip onder de huid.

Het afnemen van tussentijdse monsters van bv cerebrale vloeistoffen wordt niet overwogen omdat de veranderingen in eiwitprofielen waarschijnlijk hersendomein afhankelijk zijn en het diersoort te klein is voor het afnemen van benodigde hoeveelheden vloeistof om een assay te kunnen draaien zonder de conditie van het dier te beïnvloeden. Het afnemen van deze vloeistoffen moet onder narcose plaatsvinden wat de stress ontwikkeling zal beïnvloeden (ook in de controle dieren).

Vlak voor de isolatieperiode en de Parkinson inductie worden alle dieren geïnjecteerd met BrdU (200 mg/kg in een volume van 0,25 ml/kg LG), een analoog van thymidine welke in het DNA wordt opgenomen van prolifererende neuronen waardoor de nieuwe aanmaak van neuronen histologisch geteld kan worden. Dit is een beschreven en gevalideerde methode voor het meten van neurogenese.

Tijdens, en na de isolatieperiode en de Parkinson inductie worden alle dieren dagelijks met uitzondering van het weekend geobserveerd en wordt het lichaamsgewicht en de lichaamstemperatuur geregistreerd (zie Tabel 1). Iedere week worden de gedragstesten en het EEG/EMG gemeten. Alle metingen en registraties van gedrag vinden plaats op overeenkomende tijden bij alle dieren. Bloedmonsters voor cortisol metingen vinden tweemaal voor inductie plaats (basiswaarden) en tweemaal daarna (1x na de stress of Parkinson inductie en 1x op het eind van de studie).

Na afloop worden de dieren geofferd voor histologisch en biochemisch onderzoek waarbij enerzijds de schade in de hersenen wordt onderzocht en anderzijds eiwitten in kaart worden gebracht met specifieke aandacht voor het eiwit stathmine en alfa B-crystalline. Daarnaast wordt ook de expressie van de TLR3 receptor in de hersenen gemeten welke gekoppeld is aan de aanwezigheid van stathmine en een rol speelt bij herstelfuncties.

Gekozen wordt om een week na de inductie periode de dieren te offeren voor het identificeren van de eiwitten. Deze 'educated guess' is gebaseerd op het feit dat er nog voldoende ruimte is van een week om functionele aspecten in kaart te brengen (zie Tabel 1) en de tijd tussen inductie en meten van eiwitten niet te groot is om veranderingen in eiwitpatronen te kunnen meten. Uit recente preliminaire resultaten blijkt dat na een week de meeste gedragseffecten nog waarneembaar zijn en na twee weken een deel van de effecten hersteld zijn naar normaalwaarden. Daarom verwachten we op basis van deze laatste gegevens dat een week na inductie het meeste effect op eiwitpatronen te vinden zijn.

Het histologisch onderzoek zal worden uitgevoerd op het [REDACTED] in A'dam die ervaring hebben met het meten van schade aan de hersenen als gevolg van stress. Het meten van schade als gevolg van Parkinson zal door ons zelf gedaan worden met gebruikmaking van de apparatuur bij TNO [REDACTED]. Proteomics zal door collega's binnen TNO [REDACTED] worden uitgevoerd en de TLR3 receptor bepaling zal bij TNO [REDACTED] plaatsvinden. Voor decapitatie worden de aapjes met isofluraan/O₂ inhalatienarcose verdoofd.

Tabel 1: Overzicht van de planning van de studie.

test week	dag	MPTP*	isolatie*	HEC	Locomotor act.	Klim toren en startle response	gevoelsdrempel	observaties	Lichaams gewicht	Lichaams temperatuur	home-cage activiteit	EEG/EMG	Bloedmonster voor cortisol
1	ma												
	di												
	wo												
	do												
	vr												
	za/zo												
2	ma												
	di												
	wo												
	do												
	vr***												
	za/zo												
3	ma												
	di												
	wo												
	do												
	vr												
	za/zo												
4**	ma												
	di												
	wo												
	do												
	vr												
	za/zo												
5	ma												
	di												
	wo												
	do												
	vr												
	za/zo												
6	ma												

* afhankelijk van de testgroep wordt MPTP gegeven (groep 3) of worden de dieren geïsoleerd (groep 2). In week 4 wordt in groep 2 op di (dinsdag) het social defeat protocol toegediend.

**De donderdag (do) en vrijdag (vr) in week 4 zal worden gebruikt om de PD-inductie te titreren tot een gewenst niveau van ziekte-inductie op basis van de observaties. Het kan dus zijn dat sommige dieren een extra injectie met MPTP krijgen op donderdag en dat sommige op de woensdag (wo) de laatste toediening van MPTP krijgen.

***Op het eind van de vrijdag wordt ook een injectie met BrdU gegeven voor het meten van neurogenese processen.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	Normale huisvesting zonder PD inductie	• Aanbrengen EEG en EMG elektroden (onder isofluraan/O₂ anesthesie en lidocaine pijnstilling). • Injectie BrdU sc • EEG/EMG registratie en gedragstaken (1 x per week) • Lichaamsgewicht en gedrags-observaties (dagelijks muv weekend) • Hielprik voor bloedmonster 20 ul voor cortisol meting (1x per twee weken). • Temperatuurmeting via onderhuidse identificatiechip (dagelijks muv weekend) • Na decapitatie (onder isofluraan/O₂ inhalatie anesthesie), biochemie, histologie en proteomics.	6	Man/ vrouw
2	Isolatie huisvesting voor een periode van 2 weken	idem + Tijdens de 2 ^{de} week een korte herplaatsing in een ander territorium (< 10 min).	6	Man/ vrouw
3	PD inductie	idem + 4 tot 5 MPTP s.c. injecties (zie punt 9, groep 3)	6	Man/ vrouw
4	Reserve dieren	idem	2	Man/ vrouw

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard studieplan:

Voor deze studie worden 20 marmosetapen gebruikt (6 dieren per groep inclusief 2 reserve dieren). De dieren worden ingedeeld op basis van hun basiswaarden van de verschillende parameters waardoor gelijke groepen gevormd worden. Verder zijn de huisvesting, verzorging en biotechnische handelingen sterk gestandaardiseerd. Hierdoor worden slechts kleine verschillen in de basiswaarden tussen de groepen verwacht. Op grond van deze benadering is gekozen voor een f waarde van 0.6 en een power van 0.8. Met behulp van de Pearson-Hartley Power Charts (E.S. Pearson and H.O. Hartley, Charts of the power function for analysis of variance tests, derived from the non-central F-distribution, Biometrika, 1951, 38, 112-130), betekent dat op basis van deze aannames en het aantal groepen en ook op basis van eerdere vergelijkbare studies minstens 6 dieren per groep nodig zijn om binnen dit type onderzoek en aanwezige variatie significante verschillen te kunnen aantonen. Om ongewenste verkleining van de testgroepen te voorkomen als gevolg van onvoorziene voorvallen zoals het door omstandigheden missen van cruciale gegevens door technische problemen of dat niet voldoende dieren het gewenste criteria na training in de hand-oog coördinatie taak halen of het vroegtijdig uit de proef halen door een te grote gevoeligheid voor MPTP (zie punt 19 en 20), zijn twee reserve dieren ingepland.

Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt?

Ondanks decennia aan onderzoeksinspanningen waarbij traditionele knaagdiermodellen zijn gebruikt als model voor humane CNS aandoeningen waarbij de focus lag op neuronale functies, is het aantal effectieve therapieën voor CNS aandoeningen nog steeds alarmerend laag. Dit gebrek aan succes moedigt aan om alternatieve en betere voorspelbare modellen te ontwikkelen waaronder cel culture modellen van humane cellijnen en non-human primate modellen welke beter overeenkomen met de humane biologie. Deze met de humane situatie overeenkomende modellen zijn ook beter geschikt dan knaagdier modellen in studies waarbij de nieuwe groep van eiwit therapeutics zoals bv biologische antilichamen en growth factors waarvan de effectiviteit afhankelijk is van geschikte en overeenkomende structurele representatie van humane targets. Vanwege de translationele benadering is het van belang om naast de biologische aspecten zoals histologie en eiwitexpressie ook inzicht te krijgen over niet-invasieve gedragsmetingen waaronder slaap-waakgedrag, depressie, leervermogen en coördinatie, die ook bij de mens getoets kunnen worden. Het zijn immers de gedragsparameters die van klinisch belang voor mensen met een CNS aandoening. Nog afgezien van een meer algemene overweging dat regulatie in het CNS in non-humane primaten intrinsiek meer gelijkenis met die de mens zal vertonen dan in knaagdieren, is een non-human primatemodel zoals de marmosetaap voor deze benadering geschikt om twee andere redenen,

- In tegenstelling tot menselijk hersenmateriaal dat post-mortem wordt verkregen, is de analyse van marmoset materiaal van belang omdat daarin de balans tussen schade en herstel op een gecontroleerde en reproduceerbare manier kan worden verstoord en vastgelegd. De moleculaire samenstelling van menselijk materiaal en daardoor ook de up-regulatie of down-regulatie van de betrokken eiwitten is zeer variabel omdat de oorzaak van overlijden, de omstandigheden daaraan voorafgaand, medicijngebruik, en de tijdsduur tussen overlijden en materiaal-uitname niet onder controle is, noch te reproduceren. Dit maakt dat een betrouwbare of herhaalbare vergelijking zoals beoogd wordt in dit project onmogelijk uit te voeren is met menselijk hersenmateriaal vanwege de diversiteit van het materiaal.
- Het marmoset materiaal biedt de mogelijkheid om de analyse uit te voeren met reagentia (antilichamen, probes e.d.) die een humane specificiteit bezitten. De mate van homologie tussen eiwitten van de mens en marmoset is daarvoor meer dan toereikend, zoals gebleken is uit ons eerder onderzoek. Dit staat toe dat resultaten later kunnen worden getoetst via neuropathologisch onderzoek van menselijk materiaal zonder dat daarvoor in die situatie andere reagentia nodig zijn. Eventueel onderzoek aan knaagdieren zou dit zeer belangrijke voordeel niet hebben.

Het MPTP model in de marmoset is een internationaal geaccepteerd proefdiermodel voor de ziekte van Parkinson^{3 4}. Bovendien hebben de symptomen bij deze dieren een grote overeenkomst met die in Parkinson patiënten. Het PTSD model is al binnen onze groep opgezet, gebaseerd op literatuurgegevens waaruit blijkt dat isolatie een effect heeft op PTSD aspecten zoals een verstoorde HPA-as via veranderde cortisollevels^{5 6 7}. Belangrijke parameters blijken ook in ons model veranderd zoals cortisollevels en essentiële gedragsparameters.

In eerdere studies (DEC no 1287 en 2148) hebben we respectievelijk in het Parkinson model en in het PTSD model veranderingen op eiwitexpressie in kaart gebracht. Tijdens deze studies hebben we ons vooral gericht op

3 C. Colisimo et al. (1992) Chronic administration of MPTP to monkeys: behavioural morphological and biochemical correlations. *Neurochem. Int.* 20: Suppl: 297s-285s.

4 C.M. Waters et al. (1987) An immunohistochemical study of the acute and long-term effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the marmoset. *Neuroscience*: 23: 1025-1039.

5 Smith TE, French JA. (1997) Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys. *Physiol Behav.* 62(2):225-32.

6 Johnson EO, Kamilaris TC, Carter CS, Calogero AE, Gold PW, Chrousos GP. (1996) The biobehavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). *Biol Psychiatry*. 40(5):317-37

7 Seltzer LJ, Ziegler TE. (2007) Non-invasive measurement of small peptides in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a radiolabeled clearance study and endogenous excretion under varying social conditions. *Horm Behav.* 51(3):436-42.

het opzetten en valideren van de analyse methode. In de eerste studie die we in 2004 hebben verricht (DEC no 1287) hebben we gebruik gemaakt van verschillend type humaan donor weefsel verkregen via de hersenbank in Amsterdam. We hebben de array technieken op humaan hersenweefsel vergeleken met de toepassing in de marmosetaap. De array voor humane toepassing bleek goed bruikbaar voor de marmosetaap terwijl dit niet geldt voor knaagdieren. Deze kennisontwikkeling willen we nu toepassen om eiwitten te selecteren die betrokken zijn bij herstellfuncties. Hierdoor verbeteren we de huidige modellen voor Parkinson en voor PTSD omdat deze nieuwe markers directe markers zijn voor neuroprotectie.

Dit onderzoek kan in principe met beide seksen uitgevoerd kunnen worden. Er zijn geen aanwijzingen dat de ene sekse gevoeliger is voor de ontwikkeling van PTSD en de ziekte van Parkinson dan de andere sekse. Bovendien geeft de keuze voor beide geslachten een goede afspiegeling van de doelgroep populatie.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☐ aangekocht van proefdierfokker
- ☒ aangekocht elders, n.l.: overname marmoset kolonie in Nijmegen
- ☐ overcomplete dieren
- ☐ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- ☒ euthanasie ten behoeve van de proef: Er zal *ex-vivo* histologische en biochemische metingen in de hersenen verricht worden
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Gedurende de meeste tijd van de studie worden de marmosetapen individueel volgens de standaard richtlijnen in de gezamenlijke ruimte gehuisvest. Dit is ook van belang omdat de 'home-cage' activiteit (welke automatisch aan de kooi wordt geregistreerd) een van de parameters is. Daarnaast beïnvloed sociale huisvesting ook de observationele scores. Tijdens de PTSD inductie worden 6 dieren (groep 2) geïsoleerd gehuisvest gedurende twee weken. Daarna komen ze weer terug in hun normale situatie.

M.b.t. het houden cq. behandelen van de proefdieren bij TNO-DenV Rijswijk, wordt verwezen naar:

██████████, getiteld "Bestellen en huisvesten van proefdieren", waarin uitvoerig staat beschreven over doel, toepassing, uitvoering, werkwijze, ontvangst, uitgifte, huisvesting, gezondheidsbewaking, afvoer, kwaliteitsbewaking en ██████████, getiteld "Schoonmaken en onderhouden van de dierkamers", waarin uitvoerig staat omschreven over doel, werkkleding, schoonmaken, reinigingsmiddelen, voer, bedding, materialen, ruimte, gedragsregels, kwaliteitsbewaking en veiligheid, en ██████████, getiteld "Voorschriften en regels voor gedragsfaciliteit ██████████", waarin hetzelfde voor de gedragsfaciliteit staat beschreven. Aangenomen wordt, dat de DEC bekend is met de hierboven genoemde werkvoorschriften en deze in haar bezit heeft.

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief:

Geef hierbij, gespecificeerd **per handeling** of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1,2,3,4	20	Aanbrengen verblijfselektroden op de schedel en in de nekspier onder inhalatie narcose	1 dag	2
1,2,3,4	20	Startle reflex na korte schrikpuls van 20 ms, vaststellen gevoelsdrempel	10 min/ keer Totaal 6 keer	2
1,2,3,4	20	Gedragmetingen: observaties, activiteitsmetingen, hand-oog coördinatie, klimtoren	Metingen van 5-20 min/keer. Totaal 6 keer	1
1,2,3,4	20	Hielprik voor bloedmonster cortisol level	2 min/keer; 3keer	1
2	6	Het isoleren van de dieren; ze kunnen elkaar wel horen	2 weken	3
2	6	Social defeat: het plaatsen van het aapje bij een dominante aap	10 minuten eenmalig	4
3	6	Milde Parkinson inductie met MPTP. De totale dosis is gebaseerd op eerdere studie DEC nr 1180, 1443 en 1287 en zal in dit geval variëren tussen de 6 en 8 mg/kg MPTP	5-7 injecties. duur ziekte v. parkinson 4 weken	4

Toelichting:

- Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandelings-effect. Gebruik de codering:
 Code 1: gering
 Code 2: gering/matig
 Code 3: matig
 Code 4: matig/ernstig
 Code 5: ernstig
 Code 6: zeer ernstig
- Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het **totale ongerief** geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1	6	2
2	6	3
3	6	4
4	2	2

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Ik ben ervan bewust dat pijn een subjectieve grootte is en het moeilijk is om in te schatten wat als pijn kan worden ervaren. Parkinson patiënten melden niet dat zij pijn ondervinden; wel ongemak. Hetzelfde geldt voor patiënten die lijden aan PTSD. Om die reden wordt verondersteld dat dieren met Parkinson symptomen of met PTSD geen pijn ondervinden.

Tijdens het aanbrengen van elektroden wordt naast de anesthesie een plaatselijke pijnbestrijder lidocaine op de huid aangebracht voor het maken van de incisie. De hielprik is vergelijkbaar met de vingerprik en heeft geen pijnstilling.

Indien de dieren uit groep 3 onverhoopt toch te veel last zouden krijgen van de Parkinson symptomen, dan worden zij extra verzorgd en tijdelijk in een aparte kooi met afgeronde hoeken (soort couveuse) geplaatst waarin zij zich niet kunnen bezeren. Door de tremoren verbruiken deze dieren extra energie. Daarom wordt in deze situatie de betreffende dieren bijgevoerd met een gel met extra voedingssupplementen en calorieën. Het is onze ervaring dat de dieren met ernstige Parkinson symptomen in deze tijdelijke kooi stabiel blijven en ook snel herstellen tot een gewenst niveau. Aangezien we in deze studie een milde vorm van Parkinson gaan induceren en de looptijd van het experiment kort is, zal deze extra zorg, naar alle waarschijnlijkheid, niet nodig zijn. Op het moment van euthanasie ten behoeve van de studie is gekozen om deze te laten voorgaan door een sedatie met isoflurane.

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Indien de parkinson symptomen bij de dieren uit groep 3 ernstiger blijken dan verwacht op basis van de klinische score en de AIMS test zal een veterinaire ingeschakeld worden voor advies en verdere behandeling. Indien de situatie na ingrijpen niet verbetert, wordt besloten het dier vroegtijdig uit de studie te halen. Dit dier zal vervolgens na een diepe sedatie met ketamine-HCl 100 mg/ml (i.m. injectie; niet meer dan 0,25 ml/kg LG) geëuthaniseerd worden met euthesate (pentobarbital natrium) met een dosering van 200 mg/kg LG. Dit wordt bij voorkeur direct intracardiaal toegediend.

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Binnen deze studie zullen geen mogelijke complicaties verwacht worden. Desondanks wordt de gezondheidstoestand van de dieren, zoals bij alle marmosetapen in de kolonie, standaard in de gaten gehouden. Ook worden de dieren dagelijks geobserveerd op klinische symptomen waaronder eetlust, lichaamsgewicht en poetsen van de vacht. Mochten er te grote afwijkingen in gedrag of fysiologie waargenomen worden, zal er een veterinaire geraadpleegd worden voor adviezen ten behoeve van de gezondheid.

Vanwege de toxiciteit van MPTP kan toediening hiervan tot risico's leiden. Daarom wordt het toedieningsprotocol bijgesteld op basis van de observaties van de klinische en AIMS score indien nodig. Indien deze te hoog uitvallen (op basis van onze ervaring) zal besloten worden de MPTP dosering te verlagen dan wel te stoppen. Indien symptomen uitblijven dan zal de dosering verhoogd worden. Daarnaast zal een dierenarts bekend met marmosetaapjes bij calamiteiten opgeroepen kunnen worden en zal een neuroloog [REDACTED] geraadpleegd kunnen worden bij calamiteiten voor adviezen ten behoeve van Parkinson symptomen.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Bij onderzoek waarbij gekeken wordt naar hersenfuncties en gedragsfuncties is het noodzakelijk te werken met het intacte dier. Gezien de aard van het onderzoek (inductie van PTSD en inductie van Parkinson) is het niet mogelijk te werken met vrijwilligers. Voor de keuze van de diersoort verwijs ik ook naar punt 12.

Er is veel onderzoek gedaan naar PTSD bij de rat om mechanistische vraagstellingen te beantwoorden. Verandering in dendrietbomen, synaptische verbindingen, neuroplasticiteit en morfologische veranderingen zijn veel gebruikte parameters die uitgezocht zijn in de rat. Ondanks dat er ook gedragsveranderingen bij de rat optreden kunnen deze niet vertaald worden naar gedragskenmerken bij de mens. Hetzelfde geldt voor gedragsparameters bij de muis na PD inductie. Desalniettemin maken we voor een deel van onze toetsingsparameters in de marmoset, welke worden uitgevoerd bij [REDACTED] Amsterdam, gebruik van kennis die is opgebouwd bij de rat, m.n. de morfologische veranderingen en de neuroplasticiteit.

Daarnaast wordt binnen onze groep, als onderdeel van deze studie (zie studienummer), in een parallel onderzoek de eiwit- en genexpressie tijdens PD ontwikkeling in de muis in kaart gebracht DEC no 2313 (onderzoeker: [REDACTED]). Dit onderzoek doen we ten behoeve van de fundamentele vraagstelling over proces ontwikkeling waarbij de vroege schade/herstel processen in kaart worden gebracht. Deze veranderingen in eiwitpatronen zullen we voor zover mogelijk vergelijken met de uitkomst in de apenstudie waarbij echter niet de proces ontwikkeling centraal staat.

In een eerdere studie (DEC no 1287) hebben we reeds in het marmoset Parkinson model veranderingen in eiwitexpressie in kaart gebracht en vergeleken met humaan donor materiaal met als doel om biomarkers te identificeren (rapport en een publicatie zijn in bewerking). In die studie hebben we gebruik gemaakt van verschillend type humaan donor weefsel –waaronder ook Parkinson patiënten- verkregen via de hersenbank in Amsterdam. We hebben de array technieken op humaan hersenweefsel vergeleken met de toepassing in de marmosetaap. De array voor humane toepassing bleek goed bruikbaar voor de marmosetaap terwijl dit niet geldt voor knaagdieren. Bovendien staat in de ‘White Paper for Complete Sequencing of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Genome’ (Mansfield, Tardif and Eichler, 2004) beschreven dat het menselijk genoom ten opzichte van het marmoset genoom slechts voor 11% afwijkt, dit in tegenstelling tot de rodent-mens vergelijking waarbij ~50% afwijkt (Clamp, M. *et al.* (2003) Ensembl 2002: accommodating comparative genomics, Nucleic Acids Res. 31(1):38-42).

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

- O TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
- O Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel [REDACTED])
- O Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- X elders, n.l.: Dit is uitvoerig besproken tijdens de DEC vergadering op 15 mei 2007 (zie verder punt 21)
- O zo nee; waarom niet:

ANDERE ASPEKTEN

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

Geen andere aspecten zijn m.i. van belang voor de DEC-commissie. Wel wil ik verwijzen naar DEC no. 1374 waarbij ook het isolatieprotocol is gehanteerd. En naar DEC no. 2148 waarbij het inductie protocol voor PTSD eerder is uitgevoerd en naar DEC no. 1287 en 1985 waarbij het inductie protocol voor Parkinson eerder is toegepast (evenals in DEC no. 1180, 1443 en 1938). In DEC no. 1287 staat uitvoerig ook de experimenten met humane donor materiaal beschreven.

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

AChE	acetylcholinesterase	MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
A'dam	Amsterdam	muv	met uitzondering van
amp	ampère	kHz	kilohertz
BU	Business unit	PD	parkinson disease
CNS	centraal zenuwstelsel	PI	principle investigator
db	decibells	PTSD	post traumatisch stress disorder
DEC	dierexperimentencocommissie	REM	Rapid Eye Movement
DenV	Defensie en Veiligheid	sc	subcutaan
EEG	electroencephalogram		
EMG	electromyogram		
i.p.v.	in plaats van		Science
		TLR3	Toll-like receptor 3
		µl	microliter
mg/kg	milligram per kilogram	VU	vrije universiteit
min	minuten	WVS	werkvoorschrift
ms	milliseconden		

onderzoeker

Management

datum:

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker