

2011-20

Datum ontvangst DEC: 12 oktober 2011
12 januari 2012 final

DEC nr: 3182

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient voor de uiterste inzendtermijn (zie Spider, cluster onderzoekers Art.9) volledig ingevuld **elektronisch** in het bezit te zijn van:

E-mail: [redacted]

Postadres:

[redacted]
[redacted]
[redacted]

telefoon: [redacted]

Kerngebied en locatie: [redacted]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Inhibition of FAAH in mice

1.2. **studienummer:** nog niet bekend

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** Metabolic pathway analysis to show proof of concept for enzyme inhibiting drugs

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]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: Medio November 2011

(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 dag

Locatie waar dieren worden gehouden: dierkamer C-lab

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A/B	1	01	1	10	37	1	1	1	01	1	1	2	1
Oefen dieren	1	01	1	10	29	1	1	1	01	1	1	2	1

RELEVANTIE

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

Hoofdoel: Aantonen of sampling van Cerebrospinal Fluid (CSF) een goed model is om de remming van de hydrolyse van cannabinoiden te kunnen meten. Hiertoe worden twee groepen muizen intraveneus gedoseerd met 14C- Anandamide (AEA). De ene groep krijgt ca 1 h voor de IV dosering een IP dosering van een stof die het enzym FAAH remt. De andere groep krijgt een IP injectie van saline. 5 tot 10 minuten na de IV dosering worden de dieren opgeofferd en worden bloed (plasma), CSF, hersenen en lever verzameld. In de verzamelde monsters wordt vervolgens intact Anandamide en de afbraakproducten gemeten.

CSF afname is gekozen uit het oogpunt om het naar de mens te kunnen vertalen. De dierproef dient als proof of principle voordat een humane studie gedaan kan worden, waarbij als uitleepparameters CSF en plasma gebruikt zullen worden. Hersenhomogenaten en leverhomogenaten worden gebruikt als controle weefsel, hier is data van bekend en dienen dus als controle om te zien of de proef is geslaagd. Het vervolg van deze studie zal dan ook een humane microdosing studie zijn waarbij een lage dosis C14 gelabeld anandamide wordt toegediend en vervolgens de metabolieten in CSF gemeten worden door de AMS.

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; toepassing in farma
- 6.a.2 Economisch belang
- 6.a.3 Milieu belang
- 6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

6.b Wetenschappelijk belang:

Het in vivo aantonen van FAAH activiteit gericht op translatie naar de mens (liquor en plasma analyse) Voor sommige typen geneesmiddelen is het moeilijk de effectiviteit aan te tonen doordat ze een endogeen metabool pad remmen waarvan in vivo de activiteit moeilijk is vast te stellen. Dit kan mede komen doordat de endogene nivo's van de metaboliet al zodanig hoog zijn dat elke verandering door ingrijpen in minor pathways niet gevoelig genoeg opgepikt kan worden.

Een voorbeeld van een pathway waarbij bovenstaande het geval is bij farmaca die ingrijpen op het cannabinoid metabolisme. Het endocannabinoid systeem is een lipide signaling system met een breed functie (pijn, honger, angst). De primaire endocannabinoiden zijn arachidonoyl ethanolamide (AEA = anandamide) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) is een hydrolase verantwoordelijk voor de afbraak van fatty acid amides, waaronder anandamide (AEA), helaas is het

door de huidige technieken nog niet gelukt om een goede inhibitor in vivo te testen. Echter door anandamide te labelen met ^{14}C kunnen we specifiek het effect van de FAAH inhibitors op de afbraak van anandamide meten. Het vinden van geschikte FAAH inhibitors waarvan in vivo de functionaliteit is aangetoond kan nieuwe aangrijpingspunten opleveren voor de behandeling van pijn, obesitas, en verschillende neurologische aandoeningen.

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?

De wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan is intern beoordeeld door het impactteam van de propositie 3V. Daarnaast is het plan uitvoerig besproken met [REDACTED] verbonden aan de [REDACTED]

Zo nee, waarom niet?

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)
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DECnr.:
- ☐ 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, voorzover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

Dieren krijgen een IP injectie van een FAAH remmer/saline gevolgd door een IV injectie van ^{14}C -anandamide (1 h na IP injectie). 5 - 10 minuten na de IV injectie worden de dieren onder anaesthasie verbloed en wordt CSF, hersenen en lever verzameld.

Volume IP Injectie 3 ml/kg BW 0.5 mg URB 597/kg BW

Wikipedia: URB597 ([3-(3-carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate) is a relatively selective inhibitor of the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH). FAAH is the primary degradatory enzyme for the endocannabinoid anandamide and, as such, inhibition of FAAH leads to an accumulation of anandamide in the CNS and periphery where it activates cannabinoid receptors. In pre-clinical laboratory tests researchers found URB597 increased the production of endocannabinoids resulting in measurable antidepressant and analgesic effects.

Volume IV Injectie 3 ml/kg BW 10 mg Anandamide/kg BW.

De dosis zal een niet toxische dosis zijn.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A Controle	1 single IP dosis van saline 1 single IV dosis van 14C-Anandamide	1 IP dosering, 1 IV dosering Opofferen onder CO ₂ /O ₂ verdooving Sampelen van Bloed, CSF, hersenen en lever.	5	Man
B FAAH remmer	1 single IP dosis van FAAH remmer 1 single IV dosis van 14C-Anandamide	1 IP dosering, 1 IV dosering Opofferen onder CO ₂ /O ₂ verdooving Sampelen van Bloed, CSF, hersenen en lever.	5	Man

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:

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.

Voor dit soort proeven is 3-5 dieren per groep gebruikelijk, omdat we nauwelijks iets weten over de variatie is gekozen voor n=5.

Het samplen van de CSF via de cisterna magna is een techniek die hier nog niet wordt toegepast. De onderzoeker vraagt 10 extra dieren aan om 2 biotechnici te trainen in het verzamelen van CSF. De hoeveelheid is slechts 10-15 µl en moet snel en zonder contaminatie van bloed verzameld worden.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

De te gebruiken 14C-anandamide is erg duur. Er moet per kg lichaamsgewicht een behoorlijke hoeveelheid gegeven worden om analyses in de CSF mogelijk te maken. Daarom is gekozen voor mannelijke CD muizen. Dit type is een robuuste muis die zich goed leent voor chirurgische technieken. Er is geen indicatie van sexe-effecten. De studie wordt daarom uitgevoerd met slechts één sex. Gekozen is voor de man omdat deze wat groter zijn.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☒ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, **n.l.:**
- ☐ 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
- ☐ 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.

Acclimatization	At least 5 days prior to the experimental start date to the laboratory conditions.
Health condition	Upon arrival, the animals will be housed in a quarantine room and checked for overt signs of ill health and anomalies. During the quarantine period serological investigation of the microbiological status will be conducted in random samples. Unhealthy animals will be excluded from the study.
Environment	Animals will be kept in rooms ventilated with 9-11 air changes per hour and will be maintained at a temperature of 22 +/- 2°C and a relative humidity of at least 40% and not exceeding 65% other than during room cleaning. Lighting will be artificial with a sequence of 12 hours light and 12 hours dark
Housing	During acclimatisation, animals will be housed individually in macrolon cages with wood shavings (Espan E001) as bedding.
Diet	The animals will be allowed free access to a commercial rat diet. Each batch of this diet will be analyzed by the supplier (SDS, Special Diets services, Whitham, England) for nutrients and contaminants. Analysis certificates pertaining to the batch used in this study will be included in the study files and report.
Drinking water	Tap water will be offered ad libitum at all times.

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
A/B	10	1 IP dosering, 1 IV dosering Verbloeden middels orbita punctie onder CO2/O2 verdoving, sampelen van CSF	1 x 10 sec 1 x 30 sec 1 x	2 2 1
Oefendieren	10	Verbloeden middels orbita punctie onder CO2/O2 verdoving, sampelen van CSF	1	1

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 behandel-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
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- 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
A/B	10	2
Oefendieren	10	1

- 18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?**

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Niet van toepassing

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

Mocht de gezondheid van een dier (ineens) sterk achteruit gaan dan wordt het dier voortijdig gedood.

- 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.

Er zijn geen bijkomende en/of onbedoelde risico's

ALTERNATIEVEN

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

Geen vervanging mogelijk

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:

Het doel is om aan te tonen dat CSF sampling een geschikte methode is om de remming van FAAH te meten. Hier zijn geen alternatieven voor

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

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

☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. 030 - 69 44 167)

☐ Art. 14 functionaris ()

☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

☐ elders, n.l.:

x zo nee; waarom niet:n.v.t.

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.

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

CSF : CerebroSpinal Fluid

FAAH: Fatty acid amide hydrolase

AEA: Anandamide

Onderzoeker: [REDACTED]

Management: [REDACTED]

datum: 14-09-2011

datum:

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