

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-048

Ontvangen:06-06-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-06-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
IG 04-070

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	3	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	---	----------	--	--	--

Financieel beheerder	J
----------------------	---

Budgetnummer	30973649B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept

startdatum 06-06-2011

einddatum 9 06-06-2015

Duur van de proef¹⁰: 8 maanden

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)	A			Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. overige uitvoerenden				Art.9	
5. overige uitvoerenden				Art.12 in opleiding	1

Diergroep	1	2					
ctrl/exp/sham	sham + exp (Experiment A)	ctrl (Experiment B)					
Diersoort	Rat (02)	Rat (02)					
Stam	Sprague-Dawley transgeen HD	Sprague-Dawley					
Construct / mutatie ?	51 CAG	nee					
Herkomst (leverancier) *	01	02					
Aantal	21	11					
Geslacht	v	v					
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja					
Leeftijd/gewicht	±15-17 maanden	± 10 weken					
Doel van de proef *	32	07					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	10	10					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	05	05					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)
Titel: Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept

1. Doel van de proef.

De ziekte van Huntington (HD) is een autosomaal dominant neurodegeneratief ziektebeeld gekenmerkt door cognitieve- en motorische dysfuncties. Momenteel bestaat er nog geen effectieve behandeling. Het hoofddoel van deze studie is om te onderzoeken wat de effecten zijn van langdurige antisense oligonucleotiden (AON) toediening op Huntington symptomen en een Proof of Concept af te leveren. Deze nieuwe studie is een vervolg op een eerder succesvol uitgevoerde pilot studie (DEC 2009-149). De AON therapie is ontwikkeld door . Een vergelijkbare therapie voor de ziekte van Duchenne bevindt zich momenteel in een fase 3 studie. Het huidige experiment sluit aan bij de experimenten (2007-003, 2008-051) waarbij andere neurochirurgisch technieken worden gebruikt voor het ontwikkelen van een behandeling voor de ziekte van Huntington. Deze neurochirurgisch toepassingen worden al enkele jaren uitgevoerd (DEC-UM: 2002-62, DEC-UM 2004-060, DEC-UM 2006-079). Het doel van dit experiment is het bestuderen van de effecten van toediening van AONs op de symptomen van de ziekte van Huntington. Hierbij zullen we meer specifiek kijken naar effecten op motorische afwijkingen (chorea: abrupte, snelle en onwillekeurige bewegingen) en neuropathologie (huntingtin agregatie en neurodegeneratie). Daarnaast zullen we farmacokinetiek (absorptie, distributie, excretie van metabolieten etc.) van de AON bestuderen in controle ratten.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



De ziekte van Huntington is een sterk lichamelijk en geestelijk invaliderende, erfelijke aandoening. De ziekte wordt gekenmerkt door een progressief verloop lijdend tot de dood gemiddeld 15 tot 20 jaar na het verschijnen van de eerste symptomen. Momenteel is er geen effectieve behandeling. Het huidige transgeen rat model is zeer geschikt om de effectiviteit van toediening van AONs te toetsen. Positieve resultaten zullen fungeren als wetenschappelijke basis voor het optimaliseren van AONs en het ontwikkelen van een behandeling voor Huntington patiënten.

3. Alternatieven

Voor de genoemde dier-experimentele handelingen in dit project bestaan geen alternatieven. De effecten van AONs op de huntingtin aggregaat vorming worden reeds in in vitro condities (celculturen, humane HD fibroblasten) uitgevoerd. Voor het optimaliseren van de werking van de AONs is het noodzakelijk effecten op HD symptomen en de farmacokinetiek van het farmacon te bestuderen. Dit kan alleen worden getest in een in vivo conditie.

Huidig onderzoek kan ook niet bij mensen worden uitgevoerd op grond van de volgende punten:
i Toediening van AONs bij mensen is niet uit te voeren om het mechanisme te bestuderen om vervolgens een vergelijking te maken met Huntington patiënten.

ii. Lokalisatie van de AONs in geselecteerde hersenkernen kunnen op een non-invasieve manier niet met de huidige technieken worden bepaald.

iii. Veranderingen in aggregaatvorming in geselecteerde hersenkernen kunnen op een non-invasieve manier niet met de huidige technieken worden bepaald.

4. Ethische afweging

Patienten die lijden aan de ziekte van Huntington worden in ernstige mate belemmerd in hun dagelijks leven. De patienten laten een zowel een motorische als een cognitieve achteruitgang zien. Medicamenteuze behandeling heeft slechts een beperkt effect op alleen de motorische symptomen. Een effectieve behandeling is voor Huntington patienten nog niet beschikbaar. Het toedienen van AONs zou een mogelijke behandeling kunnen zijn, zoals dit reeds in een experimentele klinische setting wordt toegepast bij patienten met de ziekte van Duchenne. Momenteel worden er door Prosensa B.V. AONs ontwikkeld en geoptimaliseerd voor de ziekte van Huntington. Echter, voordat dit in de klinische setting kan worden toegepast, moeten een aantal zaken in een relevant model worden uitgezocht, zoals concentratie van toediening en lokale distributie van de AONs. Daarnaast is het van groot belang de effecten van de AON op HD symptomen te bepalen. Deze factoren zijn bepalend voor de werking van de AONs, en kunnen niet verder onder in vitro condities worden onderzocht. Daarom kiezen wij in deze studie voor het transgeen Huntington rat model. Dit is een gepatenteerd model en het eerste rat model dat nauwe overeenkomsten vertoont met de klinische situatie. Bovendien blijkt uit onze ervaring en ook van collega's elders dat de rat een zeer representatief model is voor het bestuderen van de effecten op de vorming van huntington aggregaten.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

HD is neurodegeneratief ziektebeeld met een autosomaal dominante overervingspatroon veroorzaakt door een expansie van onstabiele CAG trinucleotiden op het HD gen (IT15). Deze mutatie leidt tot een progressieve degeneratie van neuronen primair in het striatum en cerebrale cortex. Klinisch wordt HD gekenmerkt door bewegingstoornissen (vooral chorea's: abrupte, snelle en onwillekeurige bewegingen), cognitieve dysfuncties, en emotionele problemen (1). Ondanks dat er vele pogingen zijn gedaan is er voornamelijk geen effectieve behandeling bekend. Dit heeft deels te maken met de afwezigheid van goede dierexperimentele modellen voor HD. Er bestaan een aantal muismodellen (oa. R6/2). Deze vertonen vaak geen HD symptomen en hebben een te korte levensduur vanwege ernstige comorbiditeit zoals diabetes mellitus. Dit maakte een therapie-evaluatie onmogelijk.

In 2003, heeft de groep van [] onder leiding van [] een nieuw transgeen ratmodel voor HD geïntroduceerd (2). De ratten vertonen dezelfde genetische afwijking (CAG repeats) en hebben symptomen die sterk overeenkomen met de HD patiënt: motorische en cognitieve disfuncties. Verder is er geen sprake van co-morbiditeit die de levensduur van deze ratten beïnvloedt.

Recentelijk heeft [] een AON ontwikkeld voor de ziekte van Duchenne (3) dat aangetoond effectief blijkt in kleine groep Duchenne patiënten. Momenteel is Prosensa actief met het ontwikkelen en optimaliseren van een AON voor de ziekte van Huntington. Echter beperken de resultaten van de uitgevoerde experiment zich tot in vitro resultaten.

Bij patiënten met de ziekte van Huntington vindt aggregatie vorming van huntingtin plaats, de toediening van AONs zou deze aggregatie vorming kunnen beïnvloeden en een positief effect hebben op de klinische symptomen van het ziektebeeld.

In een reeds succesvol uitgevoerde pilot studie (2009-149) hebben wij de eerste in vivo bevindingen gedaan. Hieruit is gebleken dat het mogelijk is om AONs lokaal toe te dienen in het brein waarna verspreiding door het gehele brein optreedt. Bovendien lijkt er een vermindering van de huntingtin vorming plaats te vinden. Echter, kunnen we geen significante conclusies toekennen aan deze resultaten.

In dit project wordt onderzocht of langdurige lokale toediening van AONs een positief effect heeft op HD symptomen en neuropathologie. Daarnaast zal de farmacokinetiek van de AON worden bestudeerd. Het doel is om een 'Proof of Concept' af te leveren. Resultaten kunnen dienen als wetenschappelijke basis voor een verdere toepassing van deze techniek in de klinische setting.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is wetenschappelijk beoordeeld goedgekeurd door alle onderzoekspartners

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort, stam: In deze studie wordt gebruik gemaakt van:

- 15-17 maanden oude transgene huntingtonratten (Sprague-Dawley)
- volwassen (± 10 weken) controle ratten (Sprague-Dawley)

Herkomst: De ratten worden geleverd uit

- eigen fok door de Centrale Proefdier Voorziening (CPV) van de Universiteit Maastricht.
- geregistreerde fok in Nederland (Charles River Laboratories)

Eindbestemming: Alle ratten zullen in de proef worden opgeofferd voor histologisch en moleculair biologisch onderzoek (lokalisatie van de AONs + effecten op huntingtin aggregaat vorming).

7b. Sexe

Onze voorkeur gaat uit naar vrouwelijke ratten. De reden hiervoor is dat de vrouwelijke transgene dieren meer zijn aangedaan en op deze manier effecten beter kunnen worden bestudeerd.

We zullen bij immunocytochemisch, biochemisch onderzoek rekening houden met de aanwezigheid van de oestrogene cyclus (4-5 dagen) van de vrouwelijke ratten.

7c. Aantallen

Het betreft hier een experiment voor het bestuderen van de farmacokinetiek, gedrags- en neuropathologische effecten van de toegediende AONs. Het doel is om een Proof of Concept af te leveren. We hebben de aantal benodigde dieren bepaald aan de hand van eerdere ervaringen.

Experiment A: Effecten van AON toediening op gedrag en neuropathologie, Proof of Concept

We hebben de minimale groepsgrootte $N = 5$ als volgt bepaald:

Uit ervaring is gebleken dat voor het uitvoeren van adequate gedrags en histologische beschrijvingen van de effecten van de AON's we een minimale groepsgrootte nodig hebben $N = 5$. Op basis van eerdere experimenten hebben we de ervaring dat gemiddeld 1 op de 10 (=10%) dieren uitvalt als gevolg van misplaatsing van de canule (en dus incorrecte toediening van de AON). Daarnaast bestaat er een risico op een infectie, wat kan leiden tot exclusie van het dier. Deze infectie kan tevens van invloed kan zijn op de verspreiding van de AONs. Het verwachte uitval/exclusie van dieren op basis van infectie is 10%. Het risico op infectie wordt in alle groepen meegewogen gezien de kans bij alle dieren aanwezig is. Op basis van eerdere experimenten verwachten we geen verhoogde uitval van dieren vanwege leeftijd of de aanwezigheid van het transgene construct.

Voor alle groepen geldt de volgende berekening: $N = 5 + 10\% = 5 + 0,5 = 5,5 \rightarrow N = 6 + 10\% = 6 + 0,6 = 6,6 \rightarrow N = 7$

Groep 1: Sham (-/-) + toediening AON – Scrambled: ($N = 7$)

Groep 2: Huntington (+/+) + toediening AON – Scrambled: ($N = 7$)

Groep 3: Huntington (+/+) + toediening AON – Huntington: ($N = 7$)

Experiment B: Farmacokinetiek van HD AONs

Voor een adequate bepaling van de farmacokinetiek van de AON zullen in totaal 11 controle ratten dagelijks worden geïnjecteerd met verschillende dosissen, gedurende een periode van 4 weken, waarna de dieren worden opgeofferd. De verdeling van de ratten ($N = 11$) is als volgt

Groep 100 $\mu\text{g}/\text{dag}$: $N = 3 + 2 = 5$ (Na week 1, 2 en 3 wordt elk 1 rat opgeofferd, +2 in na week 4)

Groep 250 $\mu\text{g}/\text{dag}$: $N = 2$

Groep 400 $\mu\text{g}/\text{dag}$: $N = 2$

Groep 600 $\mu\text{g}/\text{dag}$: $N = 2$

Totaal aantal dieren: Experiment A ($N = 7 + 7 + 7$) + Experiment B ($N = 5 + 2 + 2 + 2$) = 32

5 Dierproef

8. Experiment

Het project is ingedeeld in twee experiment, A en B. In experiment A wordt met 3 groepen ratten gewerkt, waarbij twee groepen als controle groep wordt gebruikt (groep 1 en 2) en één experimentele groep (groep 3). Dit resulteert in de volgende groepen:

Groep 1: Sham (-/-) + toediening AON – Scrambled:

Groep 2: Huntington (+/+) + toediening AON – Scrambled:

Groep 3: Huntington (+/+) + toediening AON – Huntington:

In experiment B wordt met verschillende dosisgroepen gewerkt: 100, 250, 400 of 600 µg/dag. Alle ratten ondergaan éénmalig een stereotactische operatie waarbij permanent canules worden geïmplanteerd. Via deze canules zullen gedurende de studie de AONs worden geïnfundeed. De stereotactische operatie gaat als volgt (zie SOP- stereotactische operatie). Onder algehele anesthesie middels stereotactie worden wordt bij alle dieren (experiment A+B) in het ventrikel systeem bilaterale canules geïmplanteerd.

Experiment A: Effecten van AON toediening op gedrag en neuropathologie. Proof of Concept

De dieren in groep A zullen voor de canule-implantatie en aan het einde van het experiment na het verwijderen van de canule een MRI scan ondergaan. Door gebruik te maken van de MRI-scan, kunnen de effecten van de AONs op neurodegeneratie worden bestudeerd. Het dier is hierbij zijn eigen controle, waardoor het totaal aantal dieren kan worden gereduceerd. Gedurende een periode van 6-8 maanden zullen de dieren wekelijks worden geïnjecteerd met AONs (200 µg/week). Maandelijks zullen de dieren geobserveerd worden in een open veld (OF) om de locomotor activiteit te bepalen. In een home cage opstelling, waarbij het aantal choreatische bewegingen zal worden gescoord zal dienen als maat voor motorisch functioneren. Na respectievelijk 6-8 maanden zullen alle dieren worden opgeofferd middels decapitatie, om lokale verspreiding van de AON's te bestuderen. De hersenen worden bewerkt om met behulp van moleculair biologische technieken huntingtin vorming te bepalen. Daarnaast zullen post-mortem volumemetingen worden uitgevoerd om de mate van neurodegeneratie te bepalen.

Tijd	Maand 0	Maand 1	Maand 2	Maand 3	Maand 4	Maand 5	Maand 6
Wat	Voorbereiding + habituatie - Bilaterale canule implantatie - Post-operatief herstel	Bilaterale AON injectie - OF test en chorea observatie	Bilaterale AON injectie - OF test en chorea observatie	Bilaterale AON injectie - OF test en chorea observatie	Bilaterale AON injectie - OF test en chorea observatie	Bilaterale AON injectie - OF test en chorea observatie	Opofferen middels decapitatie

Tabel 1: de verschillende stappen van experiment A zijn weergegeven met tijdsduur en enige specificaties.

Experiment B: Farmacokinetiek van HD AONs

Gedurende een periode van 4 weken zullen de dieren dagelijks worden geïnjecteerd met AONs (100, 250, 400 of 600 µg/dag). Na (1,2 of 3) 4 weken zullen alle dieren worden opgeofferd middels decapitatie, om lokale verspreiding van de AON's te bestuderen. De hersenen worden bewerkt om met behulp van moleculair biologische technieken huntingtin vorming te bepalen. Daarnaast zullen cerebrospinaal vocht, bloed (plasma) en samples van diverse organen (lever en nieren) worden afgenomen om metabolieten en tox parameters te bepalen.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De bilaterale canule implantatie en het maken van de MRI-scan vinden plaats onder algehele anesthesie middels gas anesthesie, isofluraan (inductie 4%). De narcose zal onderhouden worden met isofluraan 1,5%-3%.

9b. Pijnbestrijding

De implantatie is vergelijkbaar met de de implantatie van stimulatie elektroden in de kliniek, uitgevoerd onder lokale anesthesie ingebracht. Hierbij ondervinden patiënten nauwelijks pijn waardoor ook er geen behoefte bestaat aan analgetica. Bij de proefdieren gebeurt dit onder algehele anesthesie. Daarnaast zal lokaal (op het periost) lidocaine 1% worden toegediend. Verder is de verwachting is dat de proefdieren minimaal zullen lijden. Om toch ook deze pijncomponent te bestrijden zullen de dieren een half uur pre-operatief een injectie krijgen met Temgesic (0.1 mg/kg LG per 10 uur, s.c.). Post-operatief zal, gedurende de eerste dagen, voor pijn bestrijding, gebruik worden gemaakt van een NSAID (Flunixin, 2,5 mg/kg L.G. per 12 uur, s.c.)

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De dieren worden aan het einde van de proef opgeofferd middels decapitatie. Indien tijdens de proef een dier ernstig ziek wordt of significant lijdt agv van het experiment of door een andere oorzaak (infecie, tumor etc.), het dichtzitten of beschadigen van de canule, dan zal het dier euthanasie ondergaan. Om de kans op infectie te reduceren zal er aseptisch worden gewerkt en in overleg met de proefdierdeskundige (Art. 14.) gebruik worden gemaakt van een passend antibioticum. Daarnaast is mogelijk dat de transgene ratten met de ziekte van Huntington, op oudere leeftijd (vanaf 8-12 maanden), matig tot ernstige motorsiche afwijkingen vertonen zoals een verhoogde locomotor activiteit en chorea. Chorea zijn abrupte, snelle en onwillekeurige bewegingen. Indien deze motorische afwijkingen leiden tot ernstig ongerief en onnodig lijden, zal dit worden beschouwd als humaan eindpunt. Na overleg en advies van de dierenarts van de CPV euthanasie plaatsvinden (zie bijlage, SOP - humane eindpunten). Indien er twijfel bestaat over de ernst van het lijden of de mogelijkheid van de behandeling van de oorzaak, dan zal de CPV-dierenarts (art. 14) geraadpleegd worden.

10a. Ongerief



Onderstaande tabel geeft een overzicht van de verschillende handelingen, met de daarbij behorende duur, frequentie en ongerief.

Handeling	Duur	Frequentie	Ongerief
Transport dieren	30 minuten	4 maal	03
MRI scan*	30 minuten	2 maal	03
Canule implantatie ¹⁾	60 minuten	1 maal	05
Individuele huisvesting ²⁾	<i>Vanaf operatie tot einde experiment</i>		05
AON infusie	10 minuten	dagelijks (Exp. B) wekelijks (Exp. A)	05
Gedragstesten*	5-15 minuten	maandelijks	01
Decapitatie	-	1 maal	01

¹⁾ De mate van ongerief van de implantatie is vergelijkbaar met de klinische operaties. De implantatieprocedure vindt plaats onder algehele narcose waarbij het periost eenmalig wordt aangedaan. Dit kan gezien worden als ernstig ongerief (05).

²⁾ De individuele huisvesting zal stresserend voor de dieren zijn en is vergelijkbaar met lichamelijke en emotionele inspanning bij mensen. Deze huisvesting wordt ook beschouwd als ernstig ongerief.

Alle handelingen worden uitgevoerd in alle groepen van experiment A en B, behalve * deze worden alleen uitgevoerd in alle groepen van experiment A. Dieren in experiment A die een transgeen Huntington construct dragen zullen Huntington symptomen ontwikkelen, dit wordt gezien als (extra) ongerief (03). Samenvattend kan verondersteld worden dat de experimenten ernstig ongerief voor de dieren veroorzaken.

10b. Welzijnsevaluatie

In het voorgestelde experiment wordt gewerkt met zowel gezonde als Huntington ratten. Het is te verwachten dat het welzijn van de Huntington ratten slechter is ten opzichte van de gezonde ratten door de Huntington symptomen, o.a een verslechterde motoriek. We zullen dagelijks een welzijnsevaluatie verrichten en bijhouden. Hier wordt extra aandacht besteed aan de Huntington ratten aangezien een slechter welzijn te verwachten is, op oudere leeftijd vanaf 8-12 maanden.

Daarnaast hebben zich in vorige experimenten geen ernstige situaties voorgedaan m.b.t. welzijn en ongerief, als gevolg van één van de technische handelingen. De verwachting is dat de uitkomst van dit experiment vergelijkbaar zal zijn.

11. Verzorging en huisvesting

Post-operatief zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Dit omdat de operatieve ingreep ingrijpend is en de dieren in de dagen na de operatie goed in de gaten gehouden moeten worden, bijv. water en voedsel consumptie. Het is ook bekend dat de dieren tijdelijk niet meer uit de ruif eten, maar alleen voedsel van de bodem tot zich nemen. Bovendien werden in vorige studies de ratten individueel gehuisvest (DEC-UM: 2002-62, 2004-060, 2006-079) om een goed herstel te bereiken met betrekking tot de geïmplanteerde canules. De canules dienen niet beschadigd te raken. Wanneer meerdere ratten in een kooi worden gehuisvest bestaat er een groter risico op canule beschadiging of verlies en derhalve uitval van proefdieren. Tevens kan sociale huisvesting op deze manier leiden tot ernstig letsel bij beide dieren. Het individueel huisvesten kan als ernstig ongerief worden ingeschat. De ratten hebben vrije toegang tot voeding en water.

In geval van calamiteiten dient de VO of VVO te worden gewaarschuwd.

12. Deskundigheid

De personen betrokken bij dit onderzoek hebben ruime ervaring met dergelijk onderzoek. De

bilaterale toediening van farmaca is reeds in meerdere experimenten toegepast. Tevens zijn betrokken personen bevoegd, art. 9 (VO en VVO)

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlagen: Stereotactische operatie SOP

Relevante literatuur

- 1) Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72, 971-983
- 2) Von Hörsten et al (2003). Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human Mol Genet*, 12, 617-624
- 3) Van Deutekom et al (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*, 357(26), 2677-86

Bijlage - DEC

Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept.

Standard Operating Procedure:

Stereotactische operatie

Nummer: SOP-

Versie: 11

Datum: 10 Maart 2008

Auteur:

Inleiding

Indien een onderzoeksvraagstelling verlangt dat een gedefinieerde kern in de rattenhersenen chemisch of farmacologisch wordt geprikkeld, of dat er een afleiding van hersenpotentialen wordt gemeten, kan dit worden gedaan met behulp van stereotactische procedures. De rattenhersenen zijn in kaart gebracht (e.g., Paxinos & Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press: Sydney, 1986). Nadat de kop van de rat in de gewenste positie in de stereotakter is gebracht, biedt het coördinatenstelsel van de hersenatlas de mogelijkheid de exacte positie van de verschillende gebieden te bepalen. De positiebepaling van de hersengebieden kan gedaan worden vanuit drie referentiepunten, i.e., het bregma, het lambda, of de interauraal lijn. Deze referentiepunten kunnen alleen gebruikt worden indien de rat tijdens de operatie gefixeerd is, en de positie van de manipulatorarm (met daaraan vastgemonteerd een, ijknaald, spuit, electrode, of canule) en het referentiepunt ten opzichte van elkaar hetzelfde blijft. De manipulatorarm is aan het fixatie gedeelte verbonden, en het totale apparaat wordt een stereotakter ('stereotactic frame') genoemd.

Deze methode kan ook gebruikt worden voor het plaatsen van elektrodes, waarmee de hersenactiviteit gemeten kan worden.

De mate van ongerief is 4.

NB. Alle genoemde procedures zijn beschreven voor de rat, maar gelden uiteraard ook voor de muis. Bovendien zal tijdens de gehele procedure aseptisch gewerkt worden en in overleg met de proefdierdeskundige (Art.14.) gebruik worden gemaakt van een passend antibioticum.

Anaesthesie en analgesie bij operatie

De stereotactische operatie wordt onder algehele narcose uitgevoerd, middels gas anesthesie, isofluraan (inductie 4%). De narcose zal onderhouden worden met isofluraan 1,5%-3%. Voordat de rat in de stereotakter gefixeerd wordt, dient de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen te zijn. Narcose wordt ook in de stereotakter onderhouden via het narcose masker. De ogen zullen met oogzalf worden behandeld om zodanig uitdroging te voorkomen. Ook zal gekeken worden of de ademhaling diep en regelmatig is (ook na toediening van matige pijnprikkel. Aangezien het periost wordt verwijderd op de schedel, zal tevens lokaal lidocaine op de wond worden toegediend. Om de pijn te bestrijden zullen de dieren een half uur pre-operatief een injectie krijgen met Temgesic (0.1 mg/kg per 10 uur,

s.c.). Post-operatief, zal gedurende de eerste dagen, voor pijn bestrijding, gebruik worden gemaakt van een NSAID (Flunixin, 2,5 mg/kg L.G. per 12 uur, s.c.)

Apparaat en procedures

De haren op de hoofdhuid worden afgeschoren en verwijderd. Daarna wordt de rat in de stereotakter gezet. Met behulp van twee stompe oorpennen, die in de gehoorgang van de rat gebracht worden, en een bekklem voor de snijtanden, wordt de kop van de rat gefixeerd.

Na desinfectie van de hoofdhuid met betadine wordt de schedel vrijgemaakt door een incisie in de hoofdhuid. Alle operatie materialen (scalpels, wondklemmen, naalden etc.) worden voor gebruik gedesinfecteerd in alcohol. De huid wordt zodanig gefixeerd dat de schedel goed bereikbaar is. Daarna wordt de schedel schoon en droog gemaakt met steriele watjes. De schedel wordt in een horizontale positie gebracht door de referentiepunten bregma en lambda op dezelfde hoogte in te stellen. Vervolgens wordt de middellijn (i.e., lijn door lambda en bregma) bepaald.

Nadat de rat in het stereotactische frame is gefixeerd ligt het referentiepunt voor de interauraal lijn vast. Om het referentiepunt bregma/lambda te bepalen moet de ijknaald naar het bregma/lambda gebracht worden en deze coördinaten opgeschreven worden. Deze coördinaten moeten aangepast worden aan de gewenste atlascoördinaten. Dan wordt op de laterale en de anterior/posterior coördinaten de schedel doorboord tot aan de dura (diameter van boorgat 0.8 mm). Nadat het gat in de schedel is geboord wordt de dura mater met een injectienaald doorgeprikt. Vervolgens kan men met de naald of canule naar de van te voren vastgestelde dorsoventrale coördinaat.

Plaatsen van canules

Indien men meerdere malen een farmacon wil toedienen worden vaste canules geplaatst. Zodoende hoeft men de dieren niet telkens weer te narcotiseren. Eerst worden er twee verdere gaatjes in de schedel geboord. Hier worden schroefjes (M1x2) in gedraaid die als verankering voor de canule dienen. De roestvrijstale canules hebben een buitendiameter van 0.65 mm en de binnendiameter van 0.30 mm. De canule wordt naar de van tevoren bepaalde coördinaten gebracht. Met behulp van cement (Paladur™) wordt de canule op de schedel aan de schroefjes verankerd. Men dient ervoor te zorgen dat tijdens het aanbrengen van de cement de schedel droog blijft.

Toedienen van farmacon

De antisense oligonucleotiden zullen middels een injectie via de geïmplanteerde canule gedurende een periode van 6-8 maanden, wekelijks worden toegediend.

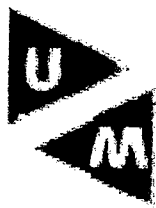
Bijlage DEC 2011-048

"Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept"

Humane eindpunten

- 1) Het is mogelijk dat de ratten door onbekende/bekende oorzaak, ernstige gewichtsafname (≥ 15 -20% lichaamsgewicht) zullen vertonen. In dit geval zal eerst advies gevraagd worden aan de dierenarts van de CPV. Aan de hand van dat advies zal er gehandeld worden. Indien nodig, dan zal de rat uit de studie gehaald worden. Om verder onnodig lijden te voorkomen, zal er dan euthanasie plaatsvinden.
- 2) Het is mogelijk dat de transgene ratten met de ziekte van Huntington, op oudere leeftijd, matig tot ernstige motorsiche afwijkingen vertonen zoals een verhoogde locomotor activiteit en chorea. Chorea zijn abrupte, snelle en onwillekeurige bewegingen. Indien deze motorische afwijkingen leiden tot ernstig ongerief en onnodig lijden, zal na overleg en advies van de dierenarts van de CPV euthanasie plaatsvinden.
- 3) Het is mogelijk dat de ratten door de canule implantatie en/of infusie een infectie krijgen. Indien dit gebeurt zal eerst advies gevraagd worden aan de dierenarts van de CPV. Aan de hand van dat advies zal er een behandeling komen. Indien dit niet resulteert in een verbetering, dan zal de rat uit de studie gehaald worden. Om verder onnodig lijden te voorkomen, zal er dan euthanasie plaatsvinden.
- 4) Het is mogelijk dat de canule dicht gaat zitten of beschadigt raakt. Indien dit gebeurt, zal om verder onnodig lijden te voorkomen, euthanasie plaatsvinden.
- 5) Het is mogelijk dat de ratten door de canule implantatie en/of infusie een hersenbloeding krijgen. Indien dit gebeurt zal eerst advies gevraagd worden aan de dierenarts van de CPV. Aan de hand van dat advies zal er een behandeling komen. Indien dit niet resulteert in een verbetering, dan zal de rat uit de studie gehaald worden. Om verder onnodig lijden te voorkomen, zal er dan euthanasie plaatsvinden.
- 6) Indien een rat ziek wordt door onbekende/bekende oorzaak, zal eerst advies gevraagd worden aan de dierenarts van de CPV. Aan de hand van

dat advies zal er een behandeling komen. Indien dit niet resulteert in een verbetering, dan zal de rat uit de studie gehaald worden. Om verder onnodig lijden te voorkomen, zal er dan euthanasie plaatsvinden.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: /

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt het budgetnummer op het voorblad in te vullen.
- Een aantal coderingen op het voorblad zijn niet juist. De DEC verzoekt deze aan te passen.
- De DEC verzoekt de eerste 3 zinnen, tot en met "B.V.", bij punt 6 te verwijderen.
- De aantallen op het voorblad en bij punt 7c zijn niet in overeenstemming. De DEC verzoekt deze in overeenstemming te brengen.
- De berekening van de aantallen is niet juist. Groep 2 en 3 verschillen, het is de DEC onduidelijk waarom dit het geval is. De uitval is niet correct berekend en dient als percentage te worden vermeld. De DEC mist de motivering voor de uitval. De DEC vraagt zich af of er uitval als ongeval van leeftijd en/of het transgene model is te verwachten?
- De DEC verzoekt bij punt 9c (humane eindpunten) te verwijzen naar de bijlage. De DEC wenste een specifiekere definiëring van de humane eindpunten (bijvoorbeeld motorische afwijkingen: welke precies?) ook in de SOP.
- De DEC verzoekt de dosering van buprenorfine aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige en het gebruik van NSAID's te overwegen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in **een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.**

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer **2011-048**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 25-04-2011

Betreft: **2011-048**

Projectaanvraag: *"Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept"*

Geachte Dr.

Naar aanleiding van uw opmerkingen en vragen hebben wij het DEC protocol aangepast daarnaast is er een extra handeling toegevoegd (tevens in grijs gemarkeerd). Hieronder volgt een korte reactie op de door u gestelde vragen en opmerkingen.

- Het budgetnummer op het voorblad is ingevuld.
- Op het voorblad is de onjuiste coderingen van de leverancier aangepast.
- De eerste 3 zinnen, tot en met "B.V.", bij punt 6 zijn verwijderd.
- De aantallen op het voorblad en bij punt 7c zijn in overeenstemming gebracht.
- De berekening van de aantallen zijn weergegeven. De berekeningen van de uitval zijn gecorrigeerd en als percentage weergegeven. Daarnaast is motivering voor de verwachte uitval toegevoegd.
- Bij punt 9c (humane eindpunten) wordt verwezen naar de bijlage. De humane eindpunten (motorische afwijkingen) zijn specifiek gedefinieerd in het protocol en de SOP humane eindpunten.
- De post-operatieve dosering buprenorfine (Temgesic) is aangepast in het DEC protocol en de SOP.
- Bij punt 10a is een tabel toegevoegd met de aard, ernst, duur en frequentie van de handeling per groep en het totale ongerief.
- Als extra handeling is het uitvoeren van een MRI scan toegevoegd, dit zal niet leiden tot een verandering in ongerief / duur van het experiment.

Indien nodig zijn we gaarne bereid tot verdere uitleg van bovenstaande punten.

Met vriendelijke groet,

Attachments: 1. Voorblad aanvraag dierproef DEC - 2011 - 048 - AON PoC en PK - herziene versie.doc; 2. DEC aanvraag - AON PoC en PK - herziene versie.doc; 3. DEC 2011-048 - SOP Stereotactie - AON PoC en PK - herziene versie.doc; 4. DEC 2011-048 - PoC Pk - Humane eindpunten - herziene versie.doc; Antwoord - DEC 2011-048.doc



Aan: 
Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 02-06-2011

Betreft: **2011-048**

Projectaanvraag: *"Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model: Proof of Concept"*

Geachte Dr

Naar aanleiding van uw opmerkingen en vragen van de herziene versie DEC 2011-048 hebben wij het DEC protocol aangepast (in grijs gemarkeerd). Hieronder volgt een korte reactie op de door u gestelde vragen en opmerkingen.

- Punt 7c, in groep 1 en 2 zal ook de plaatsing van de canule mee worden gewogen om zo als juiste controle te dienen voor groep 3. Aantallen zijn aangepast in het protocol en op het voorblad.
- Punt 9b, post-operatief, zal gedurende de eerste dagen, een NSAID gebruikt worden voor pijnbestrijding, (Flunixin, 2,5 mg/kg L.G. per 12 uur, s.c.).
- Punt 9c, het dichtzitten of beschadigen van een canule is een humaan eindpunt.
- In de SOP (stereotactie) is aangegeven dat aseptisch geopereerd zal worden en in overleg met de proefdierdeskundige (Art.14.) gebruik wordt gemaakt van een passend antibioticum.
- Punt 10a, het dragen van een transgeen Huntington construct heeft als gevolg het ontwikkelen van Huntington symptomen, dit wordt gezien als (extra) ongerief.

Indien nodig zijn we gaarne bereid tot verdere uitleg van bovenstaande punten.

Met vriendelijke groet,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
07-06-2011

Project: *Effecten van antisense oligonucleotiden toediening op Huntington symptomen in een transgeen huntington rat model.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

*Secretariaat DEC-UM***Bezoekadres**

Projectnummer: 2011-048
Diersoort: rat
Aantal dieren: 32
Einddatum: 07-06-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM