

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie**DECNR: 2011-046****Ontvangen: 05-08-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
16-08-2011	Herziene aanvraag

VROM/GGONR³

08-097 (GGO# in Groningen)

LNV/CBDNR⁴

Hoofdproject			Hersenen en gedrag				
---------------------	--	--	---------------------------	--	--	--	--

Deelproject			3				
--------------------	--	--	---	--	--	--	--

Financieel beheerder	
-----------------------------	--

Budgetnummer 300 70 000 N

Titel van het onderzoek:

Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvestingstartdatum **1-5-2011**einddatum ⁹ **1-5-2015**Duur van de proef¹⁰:

56 dagen

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. overige uitvoerenden				Art.9	
5.				Art.12	
6.					

Diergroep	1	2	3	4	5		
ctrl/exp/sham	exp	exp	contr	contr	sham		
Diersoort	2	2	2	2	2		
Stam	SD	SD	SD	SD	SD		
Construct / mutatie ?	nee	nee	nee	nee	nee		
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02		
Aantal	19	19	19	19	8		
Geslacht	♀	♀	♀	♀	♀		
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja		
Leeftijd/gewicht	180-200g	180-200g	180-200g	180-200g	180-200g		
Doel van de proef *	32	32	32	32	32		
Belang van de proef *	1	1	1	1	1		
Toxicologisch onderzoek *	1	1	1	1	1		
Bijzondere technieken *	10	10	10	10	10		
Anesthesie *	4	4	4	4	4		
Pijnbestrijding *	4	4	4	4	4		
Mate ongerief *	5	5	5	5	5		
Toestand dier einde exp*	1	1	1	1	1		

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting (EE)

1. Doel van de proef.

Het doel van deze proef is om te onderzoeken of **transplantatie van oligodendrocyte voorloper cellen (OPC) verkregen uit humane 'induced pluripotent stem cells' (IPS) cellen met/zonder verrijkte huisvesting (EE)** van ratten met een contusieletsel van het thoracale ruggenmerg een effect heeft op (1) de locomotor functie, (2) de neuropathische pijn, (3) ruggenmerg-weefschade, (4) de re-myelinisatie van axonen en (5) de neuro-inflammatoire response in het ruggenmerg.

De twee therapie-vormen die afzonderlijk en gecombineerd worden getest op hun effecten in een ratten model voor dwarslaesie zijn van grote klinische relevantie.

Het gebruik van de **OPC verkregen uit IPS cellen** voor celtransplantatie heeft vanuit klinisch perspectief vele voordelen t.o.v. andere celtypen zoals embryonale stamcellen (ES). IPS-cellen vormen een vrijwel onuitputtelijke bron voor autologe celtransplantaten, omdat uit vrijwel elk somatisch celtype (bijvoorbeeld huidfibroblasten) door geforceerde expressie van enkele pluripotentie-bepalende factoren (Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28) een pluripotente stamcel verkregen worden met eigenschappen vergelijkbaar met die van ES cellen. Gebruik van ES cellen zelf is in de kliniek zowel praktisch (vanwege de heterologie) als ethisch onmogelijk.

De proef wordt uitgevoerd door [naam] van het UMCG, Groningen ([naam]), verricht al jaren onderzoek aan IPS-OPCs in het kader van de ontwikkeling van re-myelinisatie therapieën voor demyelinisatie ziektes zoals multiple sclerosis (MS). IPS-OPCs zijn voornamelijk niet onderzocht in dwarslaesie-modellen.

Verrijkte huisvesting (**Enriched Environment/EE**) is een ratten-equivalent voor fysieke/sociale therapie in humane patiënten. De therapievorm is klinisch uiterst relevant omdat er zowel praktische als ethisch geen belemmeringen hiervoor bestaan. Daarnaast wordt er momenteel een Euregionaal dwarslaesie consortium gevormd, waarbij het revalidatie-centrum Adelante een voorname onderzoekspartner is.

De proef wordt uitgevoerd door [naam] Maastricht ([naam]), verricht al jaren onderzoek aan EE in het kader van pijnonderzoek. Hierin is onder meer naar voren gekomen dat EE de pijn in een rattenmodel voor artritis verminderd (Gabriel et al., 2009). Het effect van EE op neuropathische pijn na dwarslaesie is voornamelijk niet onderzocht.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Het beschreven onderzoek is fundamenteel, echter zeer klinisch gericht. Aangezien het primaire belang gaat om het testen van de therapeutische effectiviteit van uit IPS-OPCs en van EE op het herstel van axonale schade na spinale contusie en op het onderdrukken van neuropathische pijn, kunnen resultaten uit dit onderzoek met hoge waarschijnlijkheid tot klinische toepassing leiden op korte tot middellange termijn.

3. Alternatieven

Om de effectiviteit van celtransplantatie met (in de toekomst in klinische toepassing autologe!) humane IPS-OPCs op het beperken van blijvende axonale schade en op het onderdrukken van neuropathische pijn te bestuderen is *in vivo* onderzoek noodzakelijk. Qua metingen van neuropathische pijn wordt momenteel enkel gedragsonderzoek wetenschappelijk als 'direct-evidence' gezien, en zijn bijvoorbeeld beeldende technieken (scans) (nog) niet onlosmakelijk verbonden aan pijn. Computermodellen zijn niet voorhanden en *in vitro* systemen zijn ontoereikend vanwege hun gesimplificeerd karakter. Lagere diersoorten dan de rat zijn overwogen, maar niet geschikt vanwege het feit dat hun zenuwstelsel, indien aanwezig, te ver afstaat van dat van de mens.

4. Ethische afweging

Ondanks het ernstig dierlijk lijden dat binnen deze dieraanvraag plaatsvindt, zouden positieve resultaten die voortvloeien uit deze studie direct gevolgd kunnen worden door toepassing in de klinische behandeling van ruggenmerg schade met het reduceren van mogelijke verlamingsverschijnselen en neuropathische pijn. Dit weegt in onze ogen uiterst zwaar, m.n. omdat er nog geen enkele effectieve behandeling voor bestaat. Wij vinden het uitvoeren van deze dierproef daarom ethisch verantwoord.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

In 2006, lukte het om muizenfibroblasten te herprogrammeren tot pluripotente stamcellen door via gentransfectie de expressie te forceren van een set pluripotentie-bepalende transcriptiefactoren (Oct4, Sox2, Klf3 and cMyc) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Deze geherprogrammeerde cellen, zgn. induced pluripotent stem (iPS) cellen, vertoonden de typische embryonale stam (ES) cel kolonie morfologie en brachten dezelfde pluripotentie genen tot expressie. De verkregen muizen IPS cellen voldeden aan de meest stringente criteria voor pluripotentie inclusief teratoma vorming na subcutane injectie en de bijdrage aan de vorming van chimera dieren na injectie in blastocysten (Yamanaka, 2008; Scheper and Copray, 2009; O'Malley et al., 2009). Vervolgens toonden drie onderzoeksgroepen onafhankelijk van elkaar aan dat ook uit humane somatische cellen IPS cellen gegenereerd kunnen worden door gentransfectie en dat deze cellen van unieke waarde kunnen zijn voor de kliniek (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Aasen et al., 2008; Park et al., 2008b). De mogelijkheid om een in principe oneindig aantal patiënt-eigen pluripotente stamcellen te verkrijgen uit huidfibroblasten betekent een uniek voordeel voor celtransplantatie therapieën omdat geen afstoting meer plaats vindt. Naast gebruik in celtherapieën, is het mogelijk met de IPS technologie en ziekte-specifieke stamcellen, de celpathogene mechanismes te bestuderen ("disease-modelling") van allerlei ziektes (Colman and Dreesen, 2009; Park et al., 2008a; Saha and Jaenisch, 2009). In de afgelopen jaren is uitgebreid onderzoek verricht om tal van hindernissen op de weg naar een klinische toepassing van IPS cellen, zoals mogelijke oncogene mutaties, genomische instabiliteit en teratoma-risico, weg te nemen. De onderzoeksgroep van Groningen) verricht onderzoek naar mogelijke toepassing van IPS cellen in een remyelinisatie therapie voor demyelinisatie ziektes zoals MS; differentiatie protocollen zijn ontwikkeld voor de differentiatie van IPS cellen tot OPCs, die in-vitro en in-vivo in staat bleken axonen opnieuw te myeliniseren (Czepiel, Copray et al., in press). Een aantal onderzoeken hebben de regeneratieve effectiviteit van de transplantatie van OPCs, gegenereerd uit ES cellen implantatie, na spinale contusie in proefdieren aangetoond (Keirstead et al., 2005; Cloutier et al., 2006; Faulkner et al., 2005; Sharp et al., 2010); spinale transplantatie van humane ES-OPCs in het rat contusie model resulteerde in pathotropisme, cell survival en differentiatie, in verbeterde remyelinisatie, en herstel van locomotie zonder schadelijke bijwerkingen. Daarnaast is aangetoond dat de uit hES cellen gegenereerde OPCs een breed scala aan neurotrofe factoren, chemokines en cytokines produceren (Zhang et al., 2006). Met name een aantal van de door de OPC geproduceerde cytokines (o.a. IL-6, IL-8, TGF- β , en vele andere) hebben een sterk anti-inflammatoir effect, reduceren de doorlaatbaarheid van de bloedschermbarrière en reduceren de activatie van locale microglia en astrocyten.

Een groot aantal dierexperimentele studies met transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen (OPCs) in ruggenmerglesies en andere demyelinisatie laesies hebben laten zien dat deze exogene cellen een belangrijke bijdragen leveren aan het voorkomen en herstellen van axonale schade en daarmee bijdragen aan functioneel herstel of het voorkomen van verder functieverlies. Toepassing van een dergelijke therapeutische strategie in de kliniek is helaas niet mogelijk vanwege het niet voor handen zijn van een geschikte ruime bron voor eigen (niet afgestoten) OPCs. Als mogelijke bron voor OPCs worden momenteel humane embryonale stamcellen uitgetest maar hun klinische relevantie lijkt gering vanwege hun heterologe karakter (levenslange immunosuppressie is noodzakelijk). De ontdekking van IPS cellen heeft een uitzonderlijke onuitputtelijke bron voor eigen (geen afstoting) implanteerbare cellen binnen handbereik gebracht. Deze IPS cellen zijn net als de embryonale stamcellen pluripotent maar hun eigenschappen zijn niet geheel identiek (m.n. een afwijkende epigenetische signatuur) wat consequenties kan hebben voor hun differentiatie potentiaal en de functionaliteit en stabiliteit van de uit hen verkregen celtypes. Alvorens humane IPS cellen in de kliniek gebruikt kunnen worden, zal uiteraard in dierexperimentele studies (de dus logischerwijs xenografts) aangetoond moeten worden dat humane IPS inderdaad in staat zijn zuivere populaties OPCs te genereren die, na implantatie in laesies in diermodellen, stabiele functionele remyeliniserende cellen kunnen worden en ook door hun effect op microglia bij kunnen dragen aan functieherstel of neuropathische pijnonderdrukking. Dat is het doel van dit onderzoek.

Naast neuroprotectieve en neuro-regeneratieve interventies, bestaan er de mogelijkheid om de (functionele) uitkomst na dwarslaesie te verbeteren middels revalidatie-therapieën. Enriched environment (EE/ verrijkte huisvesting) kan gezien worden als de rat-equivalent van revalidatie-therapie in een klinische setting. Eerder preklinisch onderzoek toonde aan dat EE niet alleen de motorische uitkomst na dwarslaesie verbetert wanneer deze behandeling direct na ruggenmergletsel wordt begonnen (Lankhorst et al., 2001), maar ook wanneer EE pas vanaf 3 weken na ruggenmergcontusie in de rat wordt toegepast (Koopmans et al., 2005). Hoewel uit studies met diermodellen voor chronische pijn bekend is dat EE daarnaast leidt tot reductie van neuropathische pijn (Gabriel et al., 2009), is nog niet onderzocht of EE ook de neuropathische pijn na dwarslaesie vermindert. Er zijn concrete aanwijzingen dat de effecten van EE op chronische pijn worden verklaard via een EE-geïnduceerde vermindering van glia activatie in het ruggenmerg (Gabriel et al., 2009). In chronische pijnmodellen, waaronder dwarslaesie

modellen, treedt in het ruggenmerg een sterke glia activatie op. Deze activatie wordt met name veroorzaakt door moleculaire signalen (w.o. chemokines) die afgegeven worden door beschadigde zenuwcellen (Milligan and Watkins, 2009). De geactiveerde glia cellen geven vervolgens moleculaire mediators af (w.o. cytokines en groeifactoren) die inwerken op pijn transmissie neuronen in de dorsale hoorn van het ruggenmerg, zodat deze hyperexcitabel worden (Ji et al., 2003). Dit proces dat ook wel 'centrale sensitizatie' wordt genoemd is fundamenteel voor neuropathische pijn symptomen.

De huidige aanvraag betreft transplantatie-experimenten van uit **IPS-OPCs +/- EE** in het rat spinale contusie model met als doel om het effect te bestuderen op de volgende 5 uitleesparameters (1) neuroprotectie en (2) remyelinisatie van aangetaste axonen en op (3) verbetering van de bewegingsfunctie, (4) de verlichting van neuropathische pijn door middel van (5) reductie van de activatie van microglia en astrocyten m.b.v. de door de OPCs geproduceerde cytokines en/of EE-geïnduceerde veranderingen van glia activatie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het transplantatie onderzoek met uit IPS gegenereerde OPCs binnen het _____ is wetenschappelijk beoordeeld en akkoord bevonden door de wetenschappelijke raad van de Stichting MS Research en door de TASO commissie van ZON-MW. Daarnaast is dit DEC protocol en in bijzonder het onderzoek aan de bestrijding van neuropathische pijn, zoals beschreven in dit DEC protocol, wetenschappelijk beoordeeld en akkoord bevonden door het Pijn Kennis Centrum / _____ Maastricht en door de Nederlandse Vereniging van Anesthesiologie (NVA).

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In dit onderzoek willen we gebruik maken van vrouwelijke **Sprague Dawley ratten (circa 180-200 gram)** omdat deze in het pijnonderzoek al veelvuldig gebruikt zijn, waardoor onze resultaten goed te vergelijken zijn met andere studies in de literatuur. We willen deze ratten bij Charles River laten bestellen. De uiteindelijke bestemming van de dieren na de proef is: dood in proef.

7b. Sexe

In dit onderzoek wordt gekozen voor **vrouwelijke** ratten. Het is bekend dat het gewicht van de dieren van bepalende waarde kan zijn voor het optreden van duidelijk meetbare symptomen van neuropathische pijn in ratten (persoonlijke communicatie met . Neuropathische pijn in ratten modellen kan goed gemeten worden in ratten met een gewicht tot 250-300 gram. Vrouwelijke ratten nemen minder toe in gewicht over de tijd. Hierdoor zal er minder variatie zijn in de ontwikkeling van neuropathische pijn in onze modellen, waardoor we minder dieren per groep nodig hebben. Ter inperking van het aantal dieren willen we derhalve vrouwtjes gebruiken.

7c. Aantallen

Voor dit onderzoek wordt een aantal van **84 ratten** aangevraagd die een contusie van het ruggenmerg ter hoogte van thoracaal 10 niveau (bilateraal) zullen ondergaan.

Er wordt een spreiding (δ) van 15% in acht genomen, die overeenkomt met de spreiding in ruggenmergschade (weefsel schade) van de dieren met dit type letsel (Hains et al., 2006; Detloff et al., 2008).

Er wordt een beoogd effect (σ) van 15% in acht genomen (Koopmans et al., 2009), dat overeenkomt met het effect van beperking weefsel schade door neuroprotectieve therapie.

De powerberekening is uitgevoerd (met een met een onderscheidingsvermogen van 80% en een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0.05$) volgens de formule $n=15.7*(\sigma/\delta)^2$.

Dit leidt tot een aantal van $n=15.7$ dieren per groep (deze dieren worden ook voor histologische analyses gebruikt) in elk van de 2 groepen (groep 1 plus behandeling met IPS-OPCs, groep 2 controle vehicle injectie). Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat het uitvalpercentage gereduceerd kon worden van 20% naar 15% door preventieve baytril behandeling en manueel legen van de blaas direct na de operatie en dan 2 maal daags totdat continentie bij de dieren terug is (Van Neerven et al., 2010).

Met in acht neming van het uitvalpercentage van 15% wordt de grootte van de diergroepen dan: $15.7/0.85$: $n=19$. Een aantal van 8 verdere controle dieren (zonder ruggenmerg contusie letsel, maar met een sham-ingreep/laminectomie) zijn nodig voor vergelijkende histologische studies. Dit aantal is gebaseerd op eerder vergelijkend onderzoek (van Neerven et al., 2010).

5 Dierproef

8. Experiment

Groep 1 (n=19): *Experimentele groep* (thoracale ruggenmerg-contusie plus injectie IPS-OPCs, volume 7.5 µl met 1.5×10^6 cells; normale huisvesting)

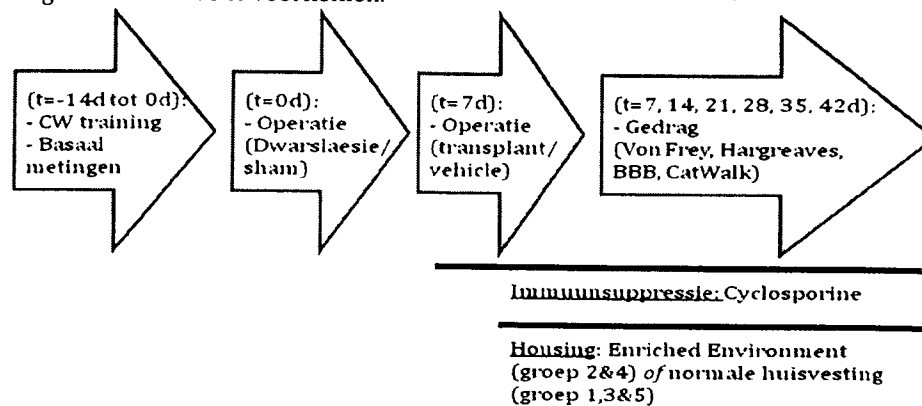
Groep 2 (n=19): *Experimentele groep* (thoracale ruggenmerg-contusie plus injectie IPS-OPCs, volume 7.5 µl met 1.5×10^6 cells; verrijkte huisvesting/EE)

Groep 3 (n=19): *Controle groep* (thoracale ruggenmerg-contusie plus injectie van vehicle oplossing; normale huisvesting)

Groep 4 (n=19): *Controle groep* (thoracale ruggenmerg-contusie plus injectie van vehicle oplossing; verrijkte huisvesting/EE)

Groep 5 (n=8): *Sham groep* (laminectomie van het ruggenmerg; geen ruggenmergletsel, i.e. sham operatie)

Dieren worden *ad random* verdeeld over de groepen 1 en 2; locomotie- en pijntesten worden geblindeerd uitgevoerd om bias te voorkomen.



Verdere details:

1. Dag 6: start immuunsuppressie middels cyclosporine injecties (20mg/kg/d subcutaan; dagelijks voor de duur van het experiment) (effectieve methode van immuunsuppressie volgens eigen ervaring en literatuur; overwogen wordt om een toedieningsmethode via subcutane osmotische pompjes; hiervan wordt momenteel de feasibility bepaald).
2. Op dag 42 worden de ratten direct na de gedragstesten geanesthetiseerd en vervolgens transcardiaal perfusie-gefixeerd, waarna het ruggenmerg wordt gebruikt voor histologisch onderzoek. Hierin spelen de sham-operatie controle dieren (groep 5) een sleutel rol voor vergelijkende histologische analyse (noodzakelijke controle voor vergelijkend onderzoek).

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Gedurende het uitvoeren van de ruggenmergcontusie en het injecteren van de uit IPS verkregen OPCs wordt gebruik gemaakt van inhalatie-anesthesie: een combinatie van isofluraan (3-4% inductie-dosis en 1-2% onderhoudsdosis) met lucht als draaggas en een optie op O₂ mocht dit nodig zijn.

9b. Pijnbestrijding

Pijnbestrijding wordt toegepast door het geven van subcutane injecties met Temgesic (Buprenorphine; 0.1 mg/kg L.G.; Schering-Plough, Utrecht, The Netherlands). Dit wordt gedaan op 60-30 min vóór operaties, binnen 4 uur na de operaties en daarna 1 maal daags tot 1 week na operatie. NSAIDs worden niet gebruikt omdat ze interfereren met de 'onset' van ontstekingsreacties die noodzakelijk zijn voor de ontwikkeling van neuropathische pijn die onderzocht wordt in deze studie.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Euthanasie van dieren wordt gedaan met een overdosis pentobarbital (150 mg/kg L.G.; intraperitoneaal). De dieren worden geperfundeerd (in geval van verdere histologische analyse) of direct afgevoerd naar de vriezer van CPV.
- **Humane eindpunten:** gedurende de gehele studie geldt dat wanneer een dier extreme vormen van ongerief vertoont (geen reacties meer op geluidssignalen, zich slap laten hangen na oppakken, zichzelf niet meer verzorgen (geen gladde huid meer), sterke gewichtsafname (meer dan 20%), en andere uiterlijke anomalieën vertonend, zoals retrograde infectie van de urinewegen) zal euthanasie worden toegepast op bovengenoemde wijze.

10a. Ongerief

Tabel

Groep	Operatie 1 (dwarslaesie/sham)	Operatie 2 (transplant/vehicle)	Pijn test (Von Frey & Hargreaves)	Motor test (BBB & CatWalk)	Immuunsuppressie (cyclosporine)	totaal ongerief
1	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 4	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 1	duur: seconden; freq: 1x/d; ongeriefscore 2	5
2	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 4	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 1	duur: seconden; freq: 1x/d; ongeriefscore 2	5
3	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 4	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 1	duur: seconden; freq: 1x/d; ongeriefscore 2	5
4	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 4	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 1	duur: seconden; freq: 1x/d; ongeriefscore 2	5
5	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 30min; ongeriefscore 5	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 4	duur: 5min; freq: 7x; ongeriefscore 1	duur: seconden; freq: 1x/d; ongeriefscore 2	5

Hoewel er in de loop van de jaren bij dit dwarslaesie-model ook een code 05 aan het ongerief werd gegeven is er toch ingegrepen om het ongerief te beperken. Zo worden dieren met ruggenmergletsels preventief behandeld met baytril om blaasproblemen tegen te gaan en wordt ook voer in de bak aangeboden in de eerste dagen na letsel wanneer motorische beperkingen eten uit de ruif bemoeilijken. De ernst van het ongerief gerelateerd aan de neuropathische pijn is een essentieel onderdeel van het pijnonderzoek en is dus nodig om onze hypothesen te testen.

10b. Welzijnsevaluatie

Van elk dier zal een welzijnsrapport worden bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren uit deze studie worden per tweetal gehuisvest in standaard bakken gedurende het gehele experiment (m.u.v. de dieren in groepen 2 en 4 die vanaf dag 7 na ruggenmergletsel in een verrijkte omgeving worden gehuisvest/Enriched Environment). Alle dieren krijgen tijdens de operatie oogzalf op de ogen aangebracht om uitdroging van de ogen tijdens de operatie te voorkomen. Alle dieren met een ruggenmergletsel krijgen preventief een subcutane injectie met Baytril (enrofloxacin 5 mg/kg L.G.) om eventuele blaasontstekingen die zich snel kunnen ontwikkelen vanwege een aanslag op de doorstroming van nieren en blaas direct te onderdrukken. Deze preventieve maatregel start op 1 dag voor operatie en zal worden voortgezet tot het postoperatieve moment dat het dier weer zelfstandig de blaas kan legen (tot dat moment wordt de blaas 2 maal daags manueel gelegeerd. Daarbij krijgen de dieren in de eerste week na operatie (standaard) voer in de bak, omdat eten uit de ruif bemoeilijkt is. In de diergroepen m.b.t. perifeer zenuwletsel zijn geen preventieve behandelingen nodig. Dieren met IPS-OPCs krijgen verder cyclosporine behandeling om afstoting van de getransplanteerde cellen te voorkomen.

12. Deskundigheid

Met betrekking tot de dierexperimentele ingrepen gaat het om operationele interventies voor het aanbrengen van een contusie-ruggenmergletsel, intraspinale injectie van IPS-OPC cellen en gedragstesten.

... zijn bevoegd tot deze ingrepen volgens de wet op dierproeven.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

SOPs over het rat ruggenmergcontusie model, celtransplantatie en gedragsexperimenten zijn bijgevoegd.

Relevante literatuur

Hains and Waxman (2006) *J Neuroscience* 26: 4308-17; Ji et al. (2003) *Trends in Neurosciences* 26: 696-705; Milligan and Watkins (2009) *Nat Rev Neurosci* 10: 23-36; Raghavendra et al. (2003) *J Pharmacol Exp Ther* 306: 624-30; Tsuda et al. (2005) *Trends in Neurosciences* 28: 101-7; Zhao et al. (2007) *J Neurosci* 27: 2357-68; Zhou et al. (2007) *J Neurochem* 102 : 667-78; Takahashi and Yamanaka (2006) *Cell* 126:663-676; Yamanaka (2008) *Cell Prolif* 41 Suppl 1:51-56; Scheper and Copray (2009) *Stem Cell Rev* 5:204-223; O'Malley et al. (2009) *Curr Opin Biotechnol* 20:516-521; Takahashi et al. (2007) *Cell* 131:861-872; Yu et al. (2007) *Science* 318:1917-1920; Aasen et al. (2008) *Nat Biotechnol* 26:1276-1284; Park et al. (2008b) *Cell Stem Cell* 5:244-247; Colman and Dreesen (2009) *Cell Stem Cell* 5:244-247; Park et al. (2008a) *Cell* 134:877-886; Saha and Jaenisch (2009) *Cell Stem Cell* 5:584-595; Keirstead et al. (2005) *J.Neuroscience* 25: 4694-4705; Cloutier et al. (2006) *Regen. Med.* 1: 469-479; Faulkner et al. (2005) *Transpl. Immunol.* 15: 131-142; Sharp et al. (2010) *Stem Cells* 28: 152-163; Zhang et al. (2006) *Stem Cells and Develop.* 15: 943-952; Gabriel et al. (2009) *Brain Res* 1276: 83-90; Koopmans et al. (2009) *Exp Neurol* 216: 490-498; Koopmans et al. (2005) *J Neurotrauma* 22: 214-225; Lankhorst et al. (2001) *J Neurotrauma* 18: 203-215.

Standard operating procedures (SOP)

SOP Ruggenmerg-contusie letsel

Contusie dorsale (spinal cord contusion injury; SCCI)

(onder goedgekeurd onder DEC 2005-153)

Operatie voor het aanbrengen van een contusie laesie in het ruggenmerg van de rat

De rat krijgt een subcutane injectie van buprenorfine (Temgesic, 0.1 mg/kg) als pre-operatieve pijnbestrijding. Daarna wordt de rat manueel gefixeerd aan het kapje van het inhalatie-anaesthesie apparaat, zodat de anaesthesie wordt geïnduceerd. Anaesthesie inductie vindt plaats via een mengsel bestaande uit lucht (met een optie op extra zuurstof) en 3-4% isofluraan. Vervolgens wordt de rat van het narcose kapje verwijderd om geschoren te worden. Met een elektrisch scheerapparaat wordt het haar op de rug (ter hoogte van de thorax) verwijderd. Daarna wordt de rat weer aan het narcose kapje gelegd. Hierbij staat het anaesthesie apparaat wederom ingesteld op 3-4% isofluraan (in lucht (met een optie op extra zuurstof)). Deze gasverhoudingen blijven aangehouden totdat de rat onder narcose is. De diagnose 'onder narcose' wordt gegeven als bij de rat de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen is. Als de rat onder narcose is, worden de gasverhoudingen van het anaesthesie apparaat aangepast tot lucht met 1-2% isofluraan. De rat ligt nu op een verwarmde plaat (37°C) om afkoeling tegen te gaan en zal hier gedurende de hele ingreep op liggen. Er wordt dan vaseline op de ogen gesmeerd om deze tegen uitdroging te beschermen tijdens de operatie. De blootgelegde huid (daar waar de haren verwijderd zijn) wordt nu gedesinfecteerd met betadine. De rat is nu klaar voor de operatie tot het aanbrengen van een compressie laesie van het ruggenmerg.

De juiste incisie hoogte wordt bepaald. Deze hoogte is ongeveer 1 cm caudaal van het punt waar het ruggenmerg op cervicaal/thoracaal niveau naar ventraal afbuigt. Op deze hoogte wordt dan een incisie gemaakt met scalpel no. 11. Hierna wordt het dorsum van de wervelkolom tussen Th8 en Th11 vrijgeprepareerd met behulp van scalpels no. 11 en met een pincet. Bloedingen tijdens de operatie worden gestelpt met absorberend en bloedstelpend spons materiaal (Spongostan Standard absorbable gelatine sponge, Ferrosan, Danmark). Het dier wordt vervolgens aan de wervels T8 en T11 opgehangen in de opstelling m.b.v. steriele tangen om het vrij geprepareerde ruggenmerg niet bloot te stellen aan de ademhalingsbeweging. Het ruggenmerg ligt nu stil en is geschikt om de laesie aan te brengen. Voor het maken van de laesie wordt gebruik gemaakt van de NYU IMPACTOR. De impactor staaf wordt precies boven het vrij geprepareerde ruggenmerg geplaatst en vervolgens op de gewenste hoogte (6.25, 12.5, 25 of 50 mm) boven het ruggenmerg ingesteld. Dan wordt met een snelle beweging het pinnetje dat de staaf op de betreffende hoogte houdt weg getrokken waardoor deze naar beneden valt en het ruggenmerg zal beschadigen. Na deze ingreep worden de spieren gehecht met behulp van hechtdraad en hechtnaalden (Acufirm, Wundnadeln G212/14). Dit wordt ook met de huid gedaan. Hierna wordt het anaesthesie apparaat ingesteld op de gasverhoudingen lucht met 0% isofluraan, zodat de rat uit de narcose kan ontwaken. Ontwaken uit de inhalatie narcose treedt in het algemeen zeer snel op (minuten). Bovenstaande narcose procedure is conform Houweling et al. 1998a en 1998b. Als het dier is bijgekomen wordt het in papier gewikkeld (om warmteverlies tegen te gaan) en in zijn kooi teruggelegd om te kunnen herstellen. Rond 17.00 uur krijgen de dieren een tweede subcutane injectie van buprenorfine (Temgesic, 0.1 mg/kg) als post-operatieve pijnbestrijding.

SOP Von Frey algesimetrie test

Von Frey test (gedragstest)

(eerder goedgekeurd onder DEC 2005-096)

In de Von Frey test wordt de drempel bepaald van de terugtrek-respons van een poot na het toedienen van een mechanische stimulus. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zogenaamde Von Frey filamenten (Stoelting, Wood dale, IL) die variëren van 1.08 gram tot 21.09 gram. De dieren worden in een plastic bak met een metalen-raster-vloer geplaatst waarin ze vrij kunnen bewegen. Er wordt een acclimatisatieperiode van 10 minuten aangehouden, zodat de dieren rustig kunnen wennen aan de omgeving voordat ze getest worden. Daarna worden Von Frey filamenten tegen het mid-plantaire oppervlak van de poot geplaatst door het metalen raster heen waar ze op staan. Dit wordt overigens alleen gedaan wanneer de rat stil staat op het metalen raster. Elk filament wordt tegen het mid-plantaire poot oppervlak gebracht totdat het filament net buigt en wordt gedurende 6-8 minuten in die positie gehouden. Het interval tussen opeenvolgende filamenten bedraagt minstens 5 seconden. Filamenten worden in een gewichtstoernemende volgorde toegepast en het laagste filament dat uit vijf pogingen minstens drie maal een terugtrek-respons van de poot veroorzaakt wordt gezien als de drempel stimulus.

SOP Hargreaves algesimetrie test

Hargreaves test (gedragstest)

(eerder goedgekeurd onder DEC 2007-096)

In de Hargreaves test wordt de drempel bepaald van de terugtrek-respons van een poot na het toedienen van een thermische stimulus. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zogenaamde radiant heat source (Harvard Apparatus, Massachusetts, USA). Het dier wordt in een plastic bak met glazen bodem geplaatst waarin ze vrij kunnen bewegen. Er wordt een acclimatisatieperiode van 10 minuten aangehouden, zodat de dieren rustig kunnen wennen aan de omgeving voordat ze getest worden. Daarna worden de thermische stimuli (via een laser) tegen het mid-plantaire oppervlak van de poot geplaatst door de glasplaat heen. Dit wordt overigens alleen gedaan wanneer de rat stil staat op de glasplaat. Meerdere temperaturen worden tegen het mid-plantaire poot oppervlak gebracht gedurende twee seconden. Het interval tussen opeenvolgende stimuli bedraagt minstens 5 seconden. Stimuli worden in een sterktoernemende volgorde toegepast en de stimulus met laagste intensiteit waarbij er uit vijf pogingen minstens drie maal een terugtrek-respons van de poot veroorzaakt wordt gezien als de drempel stimulus.

SOP CatWalk loopanalyse

CatWalk gait analysis (gedragstest)

(eerder goedgekeurd onder DEC 2006-054)

De rat wordt op een runway gezet die bestaat uit een glazen plaat. Door deze glazen plaat straalt licht. Het effect is daardoor dat bij plaatsing van bijvoorbeeld een rattenpoot de glazen plaat oplicht. Dit wordt geregistreerd door een videocamera die onder de glazen plaat gemonteerd is. De rat moet over de runway lopen naar de overgelegen, verduisterde zijde. Het looppatroon wordt door de camera vastgelegd en later door de analisten bestudeerd zoals beschreven in Hamers *et al.* (2001). Voor de detectie van de pootjes tijdens het lopen wordt gebruik gemaakt van een zwart-wit camera die de pootjes als oplichtend (wit) discrimineert van de donkere achtergrond (zwart). Echter, er is ook een mogelijkheid om een kleurencamera te gebruiken, die dan aan elk pootje een kleur kan toekennen; iets wat de analyse vergemakkelijkt. Tijdens de CatWalk test – periode staan de dieren onder een geresliceerd voedsel programma. Dit houdt in dat de dieren ná de gedragstesten 10-12 gram voedsel krijgen (gebruikelijk in de namiddag)

en vóór de gedragstesten nuchter staan (gebruikelijk in de ochtend). De dieren worden verder gemotiveerd voor de CatWalk test door voedselpellets die aan het eind van de runway liggen ter beloning.

Hamers *et al.*, (2001) *J Neurotrauma* 18(2): 187-201

SOP Celtransplantatie in ruggenmerg

Injectie van cel implantaten in het ruggenmerg

De rat krijgt een subcutane injectie van buprenorfine (Temgesic, 0.1 mg/kg) als pre-operatieve pijnbestrijding. Daarna wordt de rat manueel gefixeerd aan het kapje van het inhalatie-anaesthesie apparaat, zodat de anaesthesie wordt geïnduceerd. Anaesthesie inductie vindt plaats via een mengsel **bestaande uit lucht (met een optie op extra zuurstof) en 3-4% isofluraan**. Vervolgens wordt de rat van het narcose kapje verwijderd om geschoren te worden. Met een elektrisch scheerapparaat wordt het haar op de rug (ter hoogte van de thorax) verwijderd. Daarna wordt de rat weer aan het narcose kapje gelegd. Hierbij staat het anaesthesie apparaat wederom ingesteld op 3-4% isofluraan (in lucht (met een optie op extra zuurstof)). Deze gasverhoudingen blijven aangehouden totdat de rat onder narcose is. De diagnose 'onder narcose' wordt gegeven als bij de rat de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen is. Als de rat onder narcose is, worden de gasverhoudingen van het anaesthesie apparaat aangepast tot lucht met 1-2% isofluraan. De rat ligt nu op een verwarmde plaat (37°C) om afkoeling tegen te gaan en zal hier gedurende de hele ingreep op liggen. Er wordt dan vaseline op de ogen gesmeerd om deze tegen uitdroging te beschermen tijdens de operatie. De blootgelegde huid (daar waar de haren verwijderd zijn) wordt nu gedesinfecteerd met betadine. De rat is nu klaar voor de operatie met het injecteren van cel implantaten in het thoracale ruggenmerg.

De juiste incisie hoogte wordt bepaald. Deze hoogte wordt bepaald door de plaats waar eerder een thoracale spinale contusie laesie was aangebracht (volgens SOP), i.e. ongeveer 1 cm caudaal van het punt waar het ruggenmerg op cervicaal/thoracaal niveau naar ventraal afbuigt. Op deze hoogte wordt dan een incisie gemaakt met scalpel no. 11. Hierna wordt het dorsum van de wervelkolom tussen Th8 en Th11 vrijgeprepareerd met behulp van scalpels no. 11 en met een pincet. Bloedingen tijdens de operatie worden gestelpt met absorberend en bloedstelpend spons materiaal (Spongostan Standard absorbable gelatine sponge, Ferrosan, Danmark). Het dier wordt vervolgens aan de wervels T8 en T11 opgehangen in de opstelling m.b.v. steriele tangen om het vrij geprepareerde ruggenmerg niet bloot te stellen aan de ademhalingsbeweging. Het ruggenmerg is nu geïmmobiliseerd en is geschikt om er de celimplantaten stereotactisch in te deponeren. Een 10 µl Hamilton spuit wordt met behulp van een stereotactische manipulator in de middenlijn van het ruggenmerg gebracht op een diepte van 1.2 mm waarmee cel suspensies (of vehikel vloeistof) worden gedeponereerd op 2 plaatsen: een plek craniaal en de andere caudaal van de contusie lesie, in een totaal volume van 7.5 µl (1.5×10^6 cells) met een snelheid van 1 µl /minuut; de naald wordt verwijderd na 5 minuten. Na deze ingreep worden de spieren gehecht met behulp van hecht draad en hecht naalden (Acufirm, Wundnadeln G212/14). Dit wordt ook met de huid gedaan. Hierna wordt het anaesthesie apparaat ingesteld op de gasverhoudingen **lucht met 0% isofluraan**, zodat de rat uit de narcose kan ontwaken. Ontwaken uit de inhalatie narcose treedt in het algemeen zeer snel op (minuten). Bovenstaande narcose procedure is conform Houweling et al. 1998a en 1998b. Als het dier is bijgekomen wordt het in papier gewikkeld (om warmteverlies tegen te gaan) en in zijn kooi teruggelegd om te kunnen herstellen. Rond 17.00 uur krijgen de dieren een tweede subcutane injectie van buprenorfine (Temgesic, 0.1 mg/kg) als post-operatieve pijnbestrijding.

Lijstje met extra benodigdheden voor de DBC aanvraag

- oogzalf
- Pentobarbital
- Temgesic (buprenorphine)
- Baytril (enrofloxacin)



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: "*Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft de ethische toetsing gedaan en heeft de volgende vragen en opmerkingen:

- Bij punt 5 wenst de DEC een onderbouwing van de redenering voor de autologe transplantatie. De onderzoekers stellen op dit moment een xenotransplantatie voor. Voor de DEC is het onduidelijk hoe de uitslagen van de xenotransplantatie, in het kader van een autologe transplantatie geïnterpreteerd dienen te worden. Er zijn eerste klinische studies in de VS gestart met voorloper cellen van oligodendrocyte. De DEC vraagt zich af hoe de voorgestelde experimenten in het kader van de lopende klinische studie vallen.
- Bij punt 4 verzoekt de DEC toe te voegen, ondanks "het ernstig dierlijk" lijden. De DEC vraagt zich af of dit met lange "ij" moet?
- Bij punt 6 verzoekt de DEC aan te geven door wie of welke commissie **dit DEC** protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd.
- De DEC vraagt zich af op welke onderzoeken de genoemde sigma en delta betrekking hebben.
- De DEC mist de flowchart bij punt 8 en verzoekt deze nog toe te voegen.
- 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 (het leven met een dwarslaesie ook vermelden).
- De anesthesie in de SOP in overeenstemming brengen met punt 9a.
- De DEC verzoekt over de dosering van de pijnbestrijding contact op te nemen met de proefdierdeskundige.

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 2011-046, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Beste Leden van de DEC,

Wij hebben de vragen en commentaren die U had op onze projectaanvraag (DEC 2011-046): *“Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting”*, behandeld op de DEC vergadering van 25 maart 2011, goed ontvangen en reeds aangepast.

Onderstaand kan u onze antwoorden op de door U gestelde vragen vinden. Aanpassingen in de herziene aanvraag zijn in grijs aangeduid en bijgevoegd.

- Bij punt 5 wenst de DEC een onderbouwing van de redenering voor de autologe transplantatie. De onderzoekers stellen op dit moment een xenotransplantatie voor. Voor de DEC is het onduidelijk hoe de uitslagen van de xenotransplantatie, in het kader van een autologe transplantatie geïnterpreteerd dienen te worden. Er zijn eerste klinische studies in de VS gestart met voorloper cellen van oligodendrocyte. De DEC vraagt zich af hoe de voorgestelde experimenten in het kader van de lopende klinische studie vallen.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- Bij punt 4 verzoekt de DEC toe te voegen, ondanks “het ernstig dierlijk” lijden. De DEC vraagt zich af of dit met lange “ij” moet?
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- Bij punt 6 verzoekt de DEC aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- De DEC vraagt zich af op welke onderzoeken de genoemde sigma en delta betrekking hebben.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- De DEC mist de flowchart bij punt 8 en verzoekt deze nog toe te voegen.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- 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 (het leven met een dwarslaesie ook vermelden).
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- De anesthesie in de SOP in overeenstemming brengen met punt 9a.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven.**
- De DEC verzoekt over de dosering van de pijnbestrijding contact op te nemen met de proefdierdeskundige.
 - **Er is contact opgenomen met de proefdierdeskundige.**

Hopende hierbij Uw commentaren voldoende te hebben voorzien van antwoorden, verblijf ik,
Met vriendelijke groeten,



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, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: *“Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting”*, is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de uitleesparameter duidelijk in de tekst te vermelden.
- De DEC vindt de beantwoording van de vraag over punt 5 niet voldoende beantwoordt. Daarnaast is het voor de DEC onduidelijk of het PKC “dit DEC protocol” wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd heeft.

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 **2011-046**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Beste Leden van de DEC,

Wij hebben de enige vraag/opmerking die U had op onze projectaanvraag (DEC 2011-046): ***“Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting”***, behandeld op de DEC vergadering van 24 juni 2011, goed ontvangen.

Onderstaand kunt u onze antwoorden op de door U gestelde vraag vinden. Aanpassingen in de herziene aanvraag zijn in grijs aangeduid en bijgevoegd.

- De DEC wil graag weten welke van de 5 uitleesparameters wordt gebruikt en verzoekt dit bij punt 7c- de powerberekening- te vermelden en de DEC verzoekt niet tussentijds af te ronden.
 - **Weefselschade (en bescherming hiertegen door de therapie) na dwarslaesie is de uitleesparameter die het ‘succes’ van de therapie bepaald. Deze uitleesparameter is daarom gebruikt in de powerberekening. Dit is aangegeven in de aangepaste aanvraag; wijzigingen staan zoals gebruikelijk in grijs weergegeven (zie punt 7c)**

Hopende hierbij Uw commentaar voldoende te hebben voorzien van antwoord, verblijf ik,
Met vriendelijke groeten,



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, 29-06-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting*", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag en opmerking:

- De DEC wil graag weten welke van de 5 uitleesparameters wordt gebruikt en verzoekt dit bij punt 7c- de powerberekening- te vermelden en de DEC verzoekt niet tussentijds af te ronden.

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 **2011-046**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Beste Leden van de DEC,

Wij hebben de vragen en commentaren die U had op onze projectaanvraag (DEC 2011-046): ***“Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting”***, behandeld op de DEC vergadering van 29 april 2011, goed ontvangen en aangepast.

Onderstaand kan u onze antwoorden op de door U gestelde vragen vinden. Aanpassingen in de herziene aanvraag zijn in grijs aangeduid en bijgevoegd.

- De DEC verzoekt de uitleesparameter duidelijk in de tekst te vermelden.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven (zie punt 5)**
- De DEC vindt de beantwoording van de vraag over punt 5 niet voldoende beantwoordt. Daarnaast is het voor de DEC onduidelijk of het PKC **“dit DEC protocol”** wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd heeft.
 - **Aanpassingen zijn in grijs weergegeven (zie punt 5 en 6).**

Hopende hierbij Uw commentaren voldoende te hebben voorzien van antwoorden, verblijf ik,
Met vriendelijke groeten,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
16-08-2011

Project: *Transplantatie van oligodendrocyte precursor cellen verkregen uit humane IPS cellen na ruggenmergcontusie in ratten met/zonder verrijkte huisvesting.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
T (043)

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

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

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-046
Diersoort: rat
Aantal dieren: 84
Einddatum: 16-08-2015

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

Vicevoorzitter ~~DEC-UM~~