

	Dossier: AVD11500202418519	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	x
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Effecten van stamceltherapie op breinherstel voor bewegingsproblemen en cognitieve symptomen bij de ziekte van Parkinson.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-915824 v.1, 15-04-2025
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Ziekte van Parkinson Stamcellen Dopamine hersencellen Herstel
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Dopamine is een belangrijke boodschapperstof in het brein. Bij de ziekte van Parkinson sterven de hersencellen die dopamine gebruiken om te communiceren met andere hersencellen af, met bewegingssymptomen (bewegingssymptomen) en verstoord denken (cognitieve symptomen zoals aandachtsproblematiek) tot gevolg.</p> <p>Ons hoofddoel is om te onderzoeken of stamceltherapie het herstel van dopamine bevattende hersencellen in een muismodel voor de ziekte van Parkinson bevordert, zowel qua bewegingssymptomen als qua cognitieve symptomen. We voeren onze experimenten uit met een veel gebruikt muismodel voor de ziekte van Parkinson. Ons project heeft twee hoofddoelen:</p> <p>Doel 1: we willen de effecten en onderliggende mechanismen van stamcelbehandelingen op de bewegingssymptomen van de ziekte van Parkinson en op het herstel van dopamine bevattende hersencellen welke afsterven bij de ziekte van Parkinson) vaststellen. Hierbij testen we twee behandelingen: (i) directe toediening van stamcellen (MSCs), en (ii) deze MSC-behandeling gecombineerd met een (chemische) stof die nieuwe stamcelaanmaak bevordert.</p> <p>Doel 2: we onderzoeken hoe stamcelbehandelingen invloed hebben op daadwerkelijk afgegeven dopamine in het brein. Dit wordt in levende muizen uitgelezen, tijdens Parkinson-relevant gedrag (bijvoorbeeld tijdens beweging en tijdens cognitieve processen als aandacht en motivatie). Hiervoor gebruiken we 'sensoren voor dopamine' en voor 'hersencelactiviteit'. Deze sensoren zenden een lichtsignaal uit om te reflecteren hoe actief het dopamine systeem is tijdens gedrag relevant voor de ziekte van Parkinson.</p> <p>We verwachten dat de stamcelbehandeling gunstige effecten zal hebben op het herstel van dopamine bevattende hersencellen, en op zowel bewegingssymptomen als cognitieve symptomen. Dit onderzoek geeft daarom inzage in de potentiële bruikbaarheid van nieuwe stamcel-behandelmethoden voor de ziekte van Parkinson.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte	<p>Dit project heeft als doel om nieuwe behandelmogelijkheden voor de ziekte van Parkinson te ontwikkelen die verder gaan dan alleen het verminderen van symptomen. Het testen van stamcel-gebaseerde therapieën zou op korte termijn voordelen kunnen bieden in termen van beter begrip van hoe het dopaminesysteem in de hersenen kan herstellen. Tevens wordt nieuwe kennis opgedaan over de koppeling tussen stervende dopamine bevattende hersencellen en niet alleen beweging, maar ook cognitieve symptomen.</p> <p>Op lange termijn kan het project leiden tot de ontwikkeling van therapieën die niet alleen de symptomen van de ziekte van Parkinson verlichten, maar ook daadwerkelijk dopamine bevattende</p>

termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

hersencellen herstellen in de hersenen van patiënten. Dit zou een belangrijke stap kunnen zijn in de manier waarop hersenziekten waar hersencellen afsterven, zoals de ziekte van Parkinson, worden behandeld, waarbij niet alleen de symptomen worden verminderd, maar ook de onderliggende schade wordt gerepareerd. Dit kan een positief effect hebben op de levenskwaliteit van patiënten en mogelijk ook het verloop van de ziekte vertragen.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Dieren krijgen een operatie waarbij een bekende Parkinson veroorzakende stof in het brein wordt geïnjecteerd. De operatie zelf is eenmalig en duurt maximaal twee uur (veroorzaakt ernstig ongerief).</p> <p>Daarnaast krijgen de dieren meerdere behandelingen met stamcellen (via de neus of in de buikholte geïnjecteerd; maximaal tien injecties) (veroorzaakt licht ongerief).</p> <p>De dieren krijgen ook injecties met stofjes die herstel van dopamine hersencellen kan laten zien (via drinkwater of geïnjecteerd in de buikholte; maximaal tien injecties) (veroorzaakt licht ongerief).</p> <p>Een deel van de dieren krijgt ook een vervolgooperatie waarbij dopaminesensoren (vloeibaar) in het brein worden ingespoten. Eenmalig, maximaal 2,5 uur (veroorzaakt ernstig ongerief).</p> <p>De dieren krijgen ook verschillende gedragsmatige tests voor beweging (bewegings symptomen) en tijdens denkprocessen als aandacht, motivatie en impulscontrole (cognitieve symptomen). Tijdens deze tests wordt dan ook de activiteit van het dopamine systeem in het brein gemeten (maximaal 10 tests per dier, over een periode van max 6 maanden) (veroorzaakt licht ongerief).</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De hersenoperatie om metingen met de biosensoren (voor dopamine en hersenactiviteit) te kunnen verrichten zal voor ongerief zorgen, zoals matige pijn die maximaal een week aanhoudt. De injecties in de buikholte veroorzaken licht ongerief, zoals stress en pijn, die maximaal vijf minuten aanhoudt. Tijdens en na de operaties (onder verdoving en met pijnstilling die ook na de operatie wordt doorgezet), ondervinden de dieren ongerief zoals pijn en stress. We hebben veel ervaring met deze procedures, en weten dat het ongerief ongeveer drie dagen aanhoudt. Vanwege het nabootsen van de ziekte van Parkinson (via een hersenoperatie) zullen de dieren minder goed kunnen bewegen en vertonen ze ook beperking in cognitie (maximaal 5 maanden). Als gevolg van het nabootsen van de ziekte van Parkinson kunnen de dieren ook gewichtsverlies vertonen, maar dit gebeurt zelden.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"><thead><tr><th rowspan="2">Soort:</th><th rowspan="2">Totaal aantal</th><th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th></tr><tr><th>Terminaal</th><th>Licht</th><th>Matig</th><th>Ernstig</th></tr></thead><tbody><tr><td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td><td>1344</td><td>0</td><td>0</td><td>384</td><td>960</td></tr></tbody></table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1344	0	0	384	960
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1344	0	0	384	960												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"><thead><tr><th rowspan="2">Soort:</th><th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th></tr><tr><th>Hergebruikt</th><th>Teruggeplaatst</th><th>Geadopteerd</th></tr></thead></table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dit is niet van toepassing. In alle gevallen worden de dieren aan het eind van het experiment gedood, omdat er specifieke eiwitten in het brein geïdentificeerd moeten worden.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>De ziekte van Parkinson veroorzaakt ernstige cognitieve en bewegingsbeperkingen waardoor gedrag een belangrijke uitkomst is. Voor dit project moet dus ook verbetering in het gedrag gemeten kunnen worden, dit kan niet in een model in een kweekschaal of computer worden nagebootst. Het onderzoek kan ook niet in de mens omdat het daar niet mogelijk is om herstel van dopamine bevattende hersencellen te kunnen meten.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>De effecten worden in zowel mannetjes als in vrouwtjes getest, dus worden er minder dieren onnodig gefokt. Los van de experimentele waarde van het kennen van de effecten in beide seksen, leidt dit ook tot minder fokoverschot. Daarnaast is er ook door middel van een statistische berekening, waarbij rekening wordt gehouden met verwacht effect en variatie, berekend hoeveel dieren nodig waren om de onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De dieren zullen speciaal voer krijgen die extra voedingsstoffen bevat, of pijnstilling als ze tekens laten zien die erop wijzen dat ze pijn hebben of als ze gewicht verliezen. De dieren kunnen zichzelf trainen voor het uitvoeren van de cognitieve gedragstesten, zodat ze daarbij minder stress ondervinden dan wanneer door de onderzoeker bepaald wordt wanneer ze moeten leren.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Er zijn meerdere modellen ontwikkeld in de muis die de ziekte van Parkinson goed kunnen nabootsen. Deze modellen zijn goed gekarakteriseerd. Wij gebruiken muizen tussen anderhalve maand en zes maanden omdat de muis op deze leeftijd volwassen is en de ziekte van Parkinson een ziekte is die in volwassenen voorkomt. Daarnaast laten de muizen gedurende deze periode symptomen zien die de ziekte van Parkinson nabootsen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	18-03-2031
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--------------------------------------------------------------	--

Current version: 7.10.202503211525 (d5afd5c)Version date: 2025-03-21 15:25:31

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy policy](#) | [Legal notices](#) | [Accessibility](#)



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11500
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat- en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80.125 3508TC UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr <input checked="" type="checkbox"/> Mw
	Functie	[REDACTED]	
	Afdeling	[REDACTED]	
	Telefoonnummer	[REDACTED]	
	E-mailadres	[REDACTED]	
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569	
	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>		
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3		
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hieronder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.		
2.2 Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3		
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hieronder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6.		

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 Januari 2025
	Einddatum (t/m)	5 jaar naar verlenen vergunning
3.2 Wat is de titel van het project?	Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Effecten van stamceltherapie op breinherstel voor de bewegingsproblemen en de cognitieve symptomen bij de ziekte van Parkinson.	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
	Postadres	Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (Indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	UU-ASC	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:	
Postcode:		Plaats:	
Postbus:	80.011	Postcode:	3508TA Plaats: UTRECHT
E-mail:	asc.factuur@uu.nl		

4.2 (Optioneel.) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:	CB.841910.3.01.011
--------------	--------------------

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 1
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
Overige bijlagen, indien van toepassing	
<input type="checkbox"/> Melding machtiging	
<input type="checkbox"/>	

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	29-11-2024
Handtekening	



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	Effects of combined stem cell treatment on dopamine system integrity and circuit function during motor function and cognition behaviours in a mouse model for Parkinson's Disease.

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic research
	<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
	<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
	<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal
	<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
	<input type="checkbox"/> Higher education or training
	<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
	<input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Parkinson's disease (PD) is a detrimental neurological disorder that is becoming increasingly prevalent¹ also among people younger than 40 years of age^{1,2}. In 2022 there were 67.000 patients with PD in the

Netherlands, of which around 25% were younger than 65 years of age (<https://www.parkinson.nl/over-parkinson/wat-is-parkinson/>).

PD is associated with motor symptoms, but also with cognitive impairments, which often precede motor symptoms¹. The degeneration of midbrain dopaminergic projections from the substantia nigra to various cell types in the striatum plays an important role in both the motor and cognitive symptoms^{1,2}. Current treatments like L-Dopa administration, which pharmacologically enhance dopamine levels in the brain, at best manage symptoms, but do so less as the disease progresses, and can cause problematic side-effects². Moreover, the first PD motor symptoms are typically noticed when substantial loss of midbrain dopamine neurons has already occurred³. Thus, there is an **urgent need for novel therapies in PD that stimulate repair and recover functionality of the brain's dopamine system**. In this project we will determine the effectiveness of a combination of stem cell therapies (see below) to recover functionality of the brain's dopamine system.

To assess the effectiveness of stem cell therapy we need a well characterized PD mouse model. Indeed, studying the dopamine system's functionality at the cellular and network level, while also directly connecting this functionality to ongoing motor and/or cognitive function, requires an organism. The dopamine system, while also conserved in phylogenetically older species, shows important similarities between mammals. Humans and rodents both have the nigrostriatal pathway: dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta in the midbrain which send out their axonal projections to the dorsal striatum^{4,5}. Both in humans and in rodents this system plays a key role in both motor and cognitive performance^{4,5}. There are several well-established categories of rodent models for PD. For instance those in which (mutated forms) of the protein alpha-synuclein are overexpressed in dopamine neurons⁶⁻⁹. Such approaches model familial forms of PD, in which mutations in alpha-synuclein contribute to its misfolding, resulting in insoluble aggregates in the dopamine system (and in other parts of the brain), which are referred to as Lewy bodies. The presence of these Lewy bodies are a histological hallmark for many forms of PD, and it is linked to a damaged dopamine system¹⁰. In rodents overexpression of mutated alpha-synuclein in the dopamine system results in a chronic and progressive PD-like phenotype⁶⁻⁹. Other categories of rodent models for PD involve neurotoxic compounds which damage the dopamine system¹¹. Such approaches model sporadic forms of PD, as environmental toxins are known to confer risk for PD onset¹¹. As an example of this, injection of the neurotoxin 6OH-DA in the brains of rodents causes dopamine neuron death and the onset of both motor and cognitive deficits¹¹⁻¹³. Overall then, these two categories of models (i.e. alpha-synuclein overexpression in the brain and 6OH-DA neurotoxin infusions in the brain) are both relevant for PD, with different mechanisms of action which both converge on damage to the (dopamine) system. In other words, there is no singular primary distal cause of PD, but the proximal cause for many of the symptoms is damage to midbrain dopamine neurons.

Amongst interesting potential new treatments for PD are stem-cell based approaches. The past decade has seen two exciting developments that allow us to now preclinically (in rodents), test the efficacy of new upcoming stem cell-based PD treatment approaches.

1. [New forms of stem cell treatments]. There has been a surge in available stem cell-based approaches to stimulate brain repair, like with mesenchymal stem cells (MSCs) or with “small molecules” to activate neural stem cells (NSCs), in the brain. MSCs are multipotent stem cells that, when administered to the brain, do not differentiate into neural cells¹⁴, but instead promote repair and improve brain function in other ways. For instance by promoting NSCs to produce new neurons¹⁴, inhibiting neuro-inflammation¹⁴, and providing healthy mitochondria to

diseased cells. Rodent studies have demonstrated clear therapeutic potential of MSCs in *neonatal* brain injury^{14,15}, and also in *adult* chemotherapy-induced cognitive impairment^{16,17}. Beneficial MSC effects on lesion sizes and behaviour are durable, and do not cause tumours¹⁸. While there are also promising studies for MSCs in preclinical PD models, there is also clear variability in outcome^{19,20}. Moreover, in these studies it is unclear if the dopamine system has functionally recovered, and what the effects are on cognitive symptoms¹⁹⁻²¹. There is a phase 1 clinical trial to assess the safety of intravenous administration of MSCs to treat PD patients²². Treatment seems to have anti-inflammatory effects, and there may be partial motor symptom relief. Though whether there is real dopamine system function recovery, meaning system repair rather than behavioral symptom relief through other mechanisms, is unknown.

Interestingly, there are additional stem cell-based targeted approaches that may complement or even enhance the benefit of MSCs in a PD context. Recent work, [REDACTED] has explored how “small molecules” can be used to stimulate endogenous NSCs⁷, which persist in the aged and diseased human brain²³⁻²⁷. A small molecule of particular interest is WAY-316606 (henceforth WAY) that inhibits secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), which is in turn a suppressor of the Wnt pathway, which promotes the generation of new neurons when active. Notably, WAY stimulates proliferation of NSCs *in vitro* and *in vivo*²⁸ and our preliminary data show that this also occurs in a PD mouse model. Whether WAY can provide additive or synergistic effect with MSCs is completely unknown however.

2. [New ways to measure dopamine dynamics]. Dopamine is a complex neuromodulator of distinct striatal cell types, which use continuously changing (i.e. dynamic) dopamine input signals to coordinate motor and non-motor function on-demand²⁹. Assessing that system’s functional recovery is critical, and requires more than solely relying on the type of “static” measures (e.g. dopamine neuron count or fiber measures) that are currently often the used benchmark in PD treatment evaluation studies. There has been a recent revolution in available biosensors allowing to study the dopamine system in a much more multifaceted context than before^{30,31}. We can now evaluate dopamine system functioning in real-time (with “fiber photometry”), in a manner directly linked to PD-relevant behaviors, using high-resolution measures of not only dopamine *release*, but also its important divergent postsynaptic effects on multiple cell types. This understanding is crucial to assess real system recovery.

In this project we seek to provide a comprehensive understanding of how stem cell-based approaches, alone and in conjunction, recover PD-impaired dopamine system dynamics both in relation to motor control, and to cognitive functions. In the current proposal we primarily seek to address the remedying potential of (stem cell) treatments on the dopamine system, and the mechanisms through which such treatments act. Addressing the mechanisms of distal causes (e.g. how 6OHDA or how alphasynuclein overexpression result in damage to the dopamine system are not the primary aim of this proposal).

This project is both fundamental and translational, as we will investigate the therapeutic potential of stem cell-based approaches for PD and the biological mechanisms leading to improved behavior.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project’s immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project’s immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Our overall goal is to test whether (combined) stem cell-based treatments drive functional recovery of dopamine circuit function in PD mouse models, and improve motor and cognitive symptoms. We have the following main project aims:

Aim 1: Establish the effects and underlying working mechanisms of (combined) stem cell-based treatment approaches on PD motor symptomatology and static markers of the dopamine system. We will first determine the most suitable PD mouse model (Experiment 1A). Then (Experiment 1B) we will test distinct treatment approaches: (i) MSC administration alone, (ii) Small molecule WAY treatment alone; and (iii) MSC treatment together with the small molecule WAY. We hypothesize that the combination of MSC and the small molecule WAY has synergistic effects and will lead to the successful stimulation of brain repair in PD will have beneficial effects on PD motor symptoms and on (static markers of) dopamine system integrity, thereby limiting or reversing damage to the dopamine system. We will also (within Experiment 1B) use single-nucleus RNA sequencing to assess molecular pathways underlying stem cell treatment effects.

Aim 2: Establish how (combined) stem cell approaches impact on real-time dopamine dynamics during PD-relevant motor function and cognition. We will address if MSC treatment, small molecule treatment, and the combination of the two, promote recovery of not just static markers of the dopamine system, but also of its actual dynamic functioning during behaviors relevant to PD. It is important to evaluate how dynamic dopamine striatal (dys)function relates not only to PD motor, but also of the much less commonly-studied (yet also very debilitating) non-motor cognitive symptoms. This needs to be studied at a circuit level that takes into account the complex multi-faceted input to (Experiment 2A) and output of (Experiment 2B) the PD-impaired dopamine system.

Ultimately this project may contribute to the development of novel stem cell based approaches to treat PD patients.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We bring together a synergistic team with expertise on dopamine dynamics measurements in relevant behavioral domains for PD, and on regenerative stem cell approaches in PD. The techniques and read-outs that will be used are well-established by the applicants. The PD mouse model that we will use will be one of two well-established models (Exp. 1A determines which one) and shows impairment on both motor and cognitive behavior. The PhD student that will be hired to carry out the project will be trained and supervised by the applicants throughout the duration of the project. It is worth noting that funding for the entire PhD position has already been obtained.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

[Click or tap here to enter text.](#)

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Scientific Relevance: The incidence of PD is increasing rapidly, as is the number of patients younger than 40 years of age¹. In this project we test the efficacy of two stem cell-based approaches to reduce both motor and non-motor symptoms *and* improve dopamine circuitry. MSCs could promote functional

repair and improve brain function in PD patients. Indeed in rodent studies ■ neonatal brain injury, adult chemotherapy-induced cognitive impairment, and spinal cord injury, MSCs reduce behaviour impairment¹⁸ and lesion size¹⁵. By assessing not only one stem cell treatment approach, but a combination of two potentially complementary strategies, we adopt a broader tactic in an attempt to stimulate the brain to repair the dopaminergic system. The findings from this proposal could lead to a novel effective restorative treatment for PD patients in the future. We will not only assess behaviour as a therapeutic outcome, but also if the dopamine circuitry is restored, which is an essential outcome to ensure a long-lasting effect of the treatment. Thus, the results from this project will be of general interest to the field of brain repair, stem cell biology, and restorative clinical neuroscience.

Societal Relevance: Parkinson's disease remains a major health issue worldwide. It has been estimated that only in the Netherlands there are currently more than 65.000 people living with Parkinson's disease, including people younger than 40 years of age (from Parkinson Vereniging: <https://www.parkinson.nl/over-parkinson/wat-is-parkinson/>). It is a devastating disease that has no cure. Current treatment rely on relieving some of the symptoms, while some patients may develop insensitivity to the medication. People living with this disease become increasingly dependent upon their family and the society to provide care. It is therefore, of utmost importance to develop therapeutic strategies that can provide genuine repair for this disease. We expect that the combinatorial stem cell treatment could be beneficial for PD patients as it has the potential to stimulate repair of the dopaminergic system.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Patients and their family: Recently, ParkinsonNL carried out the project "Parkinson in kaart": <https://www.parkinson.nl/parkinson-in-kaart/>, to map the research questions that should be prioritized according to people living with PD and their relatives. From the 843 patients and 185 relatives that replied to the survey, 65% identified the development of approaches to cure PD or stop disease progression as top priorities. They consider MSC therapy very promising based on the available literature, because it may provide a truly curative/repairative therapy.

Industry: There is still no cure for Parkinson's disease. The industry would be to interested in a therapy that can provide genuine repair of the dopaminergic system, in contrast to the current therapies, which only offer symptom relieve.

Clinicians treating PD patients: A possible therapy that provides not only symptom relieve, but also repair of the dopaminergic system.

Researchers: Researchers in the field of neuroscience and neurology will be interested in this study on the efficacy of a combined stem cell treatment approach on dopamine system recovery, and recovery of motor function and cognition in a Parkinson mouse model.

Animals: We take all actions to ensure that the research with the animals is done in a responsible manner, with as little discomfort to the animals as possible and as few animals as necessary to answer these research questions on the potential benefit of stem cell therapies in PD.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Aim 1: Establish the effects and underlying working mechanisms of (combined) stem cell-based treatment approaches on PD motor symptomatology and static markers of the dopamine system.

Aim 1 has two main separate experiments, for which we here separately delineate the strategy below.

Experiment 1A: Selecting the PD model.

Alpha-synuclein overexpression into the dopamine system, and 6-OHDA neurotoxic lesions of the dopamine system, are two commonly used rodent models for PD (see 3.1). Despite their common use and efficacy, there is also heterogeneity reported between labs in terms of effect sizes and the speed with which they occur (see 3.1). Given that we will evaluate the therapeutic effect of stem cell approaches in a PD model, it is important that we establish the PD model that we will primarily work with in the rest of the project.

Strategy (see table below for experimental groups):

Mice will receive stereotactic surgery of substances in the brain to cause damage to the dopamine system. We will compare two types of substances, and for each we will evaluate their effect on dopamine neuron loss and motor behavior at two separate time points after injection.

In the alpha-synuclein overexpression model, the PD phenotype will be induced by overexpressing a mutated form of the PD risk protein alpha-synuclein in the dopamine system of the brain. To that end we will perform stereotaxic surgery in the mice during which we infuse AAVs in the dopamine system to express alpha-synuclein transgenes. As a control, control (e.g. fluorescent) proteins are virally expressed. In the 6-OHDA model, the PD phenotype will be induced by stereotactically injecting the neurotoxin 6-OHDA into the dopamine system. Vehicle substance will be injected in control groups.

After induction of the PD phenotype we will evaluate the motor function of the mice (behavioral test, in vivo) and the amount of midbrain dopamine neurons (microscopy-based cell count of immunohistochemically identified dopamine neurons in the region, post-mortem). For each of the two models we will do this at two time points which will indicate speed of onset and effect size over time. Time points of evaluation differ between the models, reflecting their typical evaluation moments.

Overview of group design:

Exp group ID	PD model	Stereotaxic injection in the brain	Time point evaluated after injection	Primary read-outs
Exp 1A-Group 1	Alpha synuclein model	AAV control protein	8 weeks	1. Dopamine neuron survival.
Exp 1A-Group 2		AAV control protein	16 weeks	
Exp 1A-Group 3		AAV alpha synuclein	8 weeks	2. Motor function.
Exp 1A-Group 4		AAV alpha synuclein	16 weeks	
Exp 1A-Group 5		Vehicle injection	3 weeks	
Exp 1A-Group 6		Vehicle injection	8 weeks	

Exp 1A-Group 7	6OH-DA model	6OH-DA injection	3 weeks	
Exp 1A-Group 8		6OH-DA injection	8 weeks	

Outcome (Selection points and Go/No go): Based on this experiment we will select for the rest of the project the PD model and the time point that we will use to start the stem cell treatments. We will use that model and time point that gives a reduction of at least 30% in substantia nigra dopamine neurons, and that results in a concomitant significant decrease in motor function of at least 20%. The likelihood that we will obtain these results with the 6OH-DA model is very high as this is a potent neurotoxin. Compared to the 6OH-DA model, the alpha-synuclein model is expected to have effects with a slower onset, and a smaller magnitude. If the alpha-synuclein model nevertheless reaches the indicated effect size benchmarks then we will prefer its use as it models the progressive aspect of PD more than the 6OH-DA model does.

Experiment 1B: Determining the effects of single and combined stem cell treatments on motor function recovery, and on dopamine neuron survival, and the molecular pathways mediating the reparative effect.

Here we will compare which MSC treatment frequency gives the strongest effect in the PD model of choice (see Experiment 1A). Specifically, we will establish whether MSC administrations in combination with the small molecule WAY has synergistic effects in comparison to MSC only in terms of motor function gain and static dopamine system integrity, after PD induction.

Strategy (see table below for experimental groups):

Using the selected PD model (Experiment 1A), we will test two treatment approaches: intranasal MSC administration alone, and a combination of such intranasal MSC administration and intraperitoneal injection of the small molecule WAY. We will provide these treatments within six weeks after a PD phenotype has been established (Go/No-go: choice of model in Exp 1A). Treatments will be administered three times every two weeks. [REDACTED] intra-nasal delivery in mice, [REDACTED] is a non-invasive procedure involving the mouse sniffing up a droplet from a pipet (pipet does not go into the nose of the mouse).

Primary read-outs are motor function (in vivo, behavioral task), and the extent of dopamine neuron loss and repair (post-mortem, microscopy), as also discussed in Exp 1A. Moreover, we will also use some of the dopamine system post-mortem brain tissue to assess through which molecular pathways the stem cell treatments work. As discussed above we hypothesize that MSCs do not differentiate into neural cells¹⁴, but instead promote repair and improve brain function in other ways. For instance by inhibiting neuro-inflammation¹⁴. This would allow NSCs (stimulated by the small molecule) to produce new neurons with better survivability¹⁴. To analyse whether anti-inflammatory pathways and neurogenesis pathways are indeed involved in the treatment, we will take advantage of the already present brain tissue that we need to harvest in the experiment, and perform single-nucleus RNA-sequencing (snRNAseq) on the dopaminergic system. For instance here we will evaluate whether the stem cell treatments affect inflammatory phenotypes of microglia and astrocytes.

Overview of group design:

Exp group ID	PD induction	Stem cell treatment	Read-outs
Exp 1B-Group 1	No.	No	1. Dopamine neuron survival.
Exp 1B-Group 2	Yes: Exp. 1A model.	No	2. Motor function.
Exp 1B-Group 3		MSCs only	
Exp 1B-Group 4		WAY only	
Exp 1A-Group 5		MSCs and WAY	3. RNA analysis of affected pathways.

Outcome: Experiment 1B will give important insights in the effects of stem cell therapies on both motor symptoms, and on repair of the dopamine system in a PD model. It will also give us insight into the molecular pathways underlying the effects of stem cell treatment. In parallel to Experiment 1B we will perform Experiments 2A and 2B (see below) to be able to perform a complementary and comprehensive analysis on how stem cell therapies affect the dopamine system in all its facets, on both motor and cognitive symptomatology.

Aim 2: Establish how (combined) stem cell approaches impact on real-time dopamine dynamics during PD-relevant motor function and cognition.

In Aim 2 we go beyond evaluating the effects of stem cell treatments on the anatomical integrity of the dopamine system and general motor function (Aim 1). Because dopamine release is not simply intact or absent. Dopamine release in target brain structures like the striatum occurs in specific spatial and temporal profiles. These patterns can facilitate motor function, but also cognitive performance (e.g. attention, impulse control, and motivation), which is also perturbed in PD^{5,32-35}. Moreover, the dopamine input signal to a region like the striatum can lead to opposite activity states in different neurons that are intermingled in the structure, depending on the type of dopamine receptor the individual neurons express (e.g. dopamine 1 or dopamine 2 receptor). The balance in activity in these distinct populations of dopamine receptor expressing neurons determines movement and cognition processes^{4,29}. In Aim 2, in two experiments, we address how stem cell treatment recovers dopamine system activity dynamics during motor performance and cognitive function in a PD model.

The outcome of Experiment 1A informs the choice of the PD model for Experiment 2A and 2B. Experiment 2A and 2B (functional recovery of the dopamine system) will be performed in parallel to Experiment 1B (structural and motor recovery of the dopamine system). This is because dopamine system structure and function are partly, but not fully dependent on one another. So function cannot be fully predicted from structure or from improved motor behavior. That is because there are more factors that determine dopamine release in the striatum than only the amount of dopamine neuronal cell bodies and fibers. For instance factors such as when the dopamine neurons become active and how much clearance of dopamine there is when it is released^{36,37}. Improved motor behavior also does not necessarily mean that the dopamine system is fully functional. Similarly, the activity balance of striatal neuronal subpopulations, which is influenced by dopamine, is dependent on more factors than only such dopaminergic input. For instance factors such as the biophysical properties of those cells as well as their synaptic input^{4,29}. Overall this means that there can be a partially different (better or worse) dynamic functional recovery than one seen in structural analysis. To do a comprehensive analysis of the effects of stem cells we therefore perform Experiments 1B and 2A and 2B in parallel.

Experiment 2A: Evaluating the recovery of dopamine system *input signals* during motor and cognitive function after stem cell treatment in PD.

Here we evaluate the effect of stem cell treatment on the dynamics of the *dopamine input signals* to the striatum during motor and cognitive function in a PD model.

Strategy (see table below for experimental groups):

We will perform stereotaxic surgery in the mice to virally (AAV) express biosensors in their dopamine system. We also stably secure optic fibers in the brain above the fluorescent sensors to permit stable chronic measurements of dopamine-related signals in real-time.

Mice will be trained on motor and cognitive tasks. We intend to use singular cognitive tasks that in one go assess motivation, impulse control and attention. For this, we will use the self-paced version of the 5 choice serial reaction time task (sp-5CSRTT) that the mice train themselves on (see appendix)⁴⁰. We have ample experience with this task and mice attain steady performance in it within 3 weeks.

Then the PD state will be induced (using the preferential model obtained from Experiment 1A), and stem cell treatments will be provided as in Experiment 1B. Then biosensor measurements will be made of dopamine system activity in real-time while mice are performing motor and cognitive tasks. These recordings will be done at multiple time points, including measurements during the course of the PD state prior to stem cell treatment, and then after stem cell treatment.

Overview of group design:

Exp group ID	PD induction	Stem cell treatment	Read-outs
Exp 2A-Group 1	No.	No	1. Dopamine system activity in real-time during motor acts, and during cognition. 2. Task performance (cognitive task and motor task).
Exp 2A-Group 2	Yes: Exp. 1A model.	No	
Exp 2A-Group 3		MSCs only	
Exp 2A-Group 4		WAY only	
Exp 2A-Group 5		MSCs and WAY	

Experiment 2B: Evaluating the recovery of dopamine system *output signals* during motor and cognitive function after stem cell treatment in PD.

As mentioned, the dopamine input signal can lead to opposite effects in distinct innervated neurons, primarily depending on the type of dopamine receptor they express. Specifically in the striatum the vast majority of neurons express either a dopamine 1 (D1R) or a dopamine 2 (D2R) receptor. The activity balance between these D1R- and D2R-expressing neurons is crucial for motor initiation and cognition, since medium spiny neurons with a D1R and those with a D2R can even play opposite roles in motor

behavior and cognition^{4,29}. Consequently it is important to understand the consequences of the stem cell treatment on the balance of activity of D1R and D2R medium spiny neurons. Here we evaluate the effect of stem cell treatment on the activity levels of the different types of dopamine-sensitive striatal regions during motor and cognitive function in a PD model.

Strategy (see table for experimental groups):

Here we will use transgenic mice with expression of Cre or FLP recombinases in specific populations of neurons such as D1R neurons or D2R neurons, to be able to target these distinct populations specifically (with AAVs that only express their biosensor in cells with Cre or FLP). The general strategy is otherwise largely similar to that of Experiment 2A, with the key exception that here we will express biosensors for neural activity (like calcium sensors) instead of dopamine sensors. We will measure in one animal from the D1R population and the D2R population in the striatum, by using different color fluorescence calcium sensors.

Exp group ID	PD induction	Stem cell treatment	Read-outs
Exp 2B-Group 1	No.	No	1. Striatal D1R and D2R neuronal subgroup activity patterns in real-time during motor acts, and during cognition. 2. Task performance (cognitive task and motor task).
Exp 2B-Group 2	Yes: Exp. 1A model.	No	
Exp 2B-Group 3		MSCs only	
Exp 2B-Group 4		WAY only	
Exp 2B-Group 5		MSCs and WAY	

Outcome: Experiments 2A and 2B will determine the effects of stem cell therapies on both motor and cognitive symptoms, in direct relation to the functional recovery of the dopamine system. It is important to have insights in both the extent of neurophysiological recovery of the dopamine system and of the motor and cognitive symptoms. Especially if it were to be the case that the treatments give partial behavioral recovery, it would be important to understand where further gains, on a neurobiological level, would need to be made (e.g. is the dopamine input signal insufficiently rescued, and/or is the balance of activity of D1R and D2R medium spiny neurons not sufficiently restored? Having insight in both neurophysiological and behavioral consequences of the treatment allows that necessary depth of analysis, with also future research in mind.

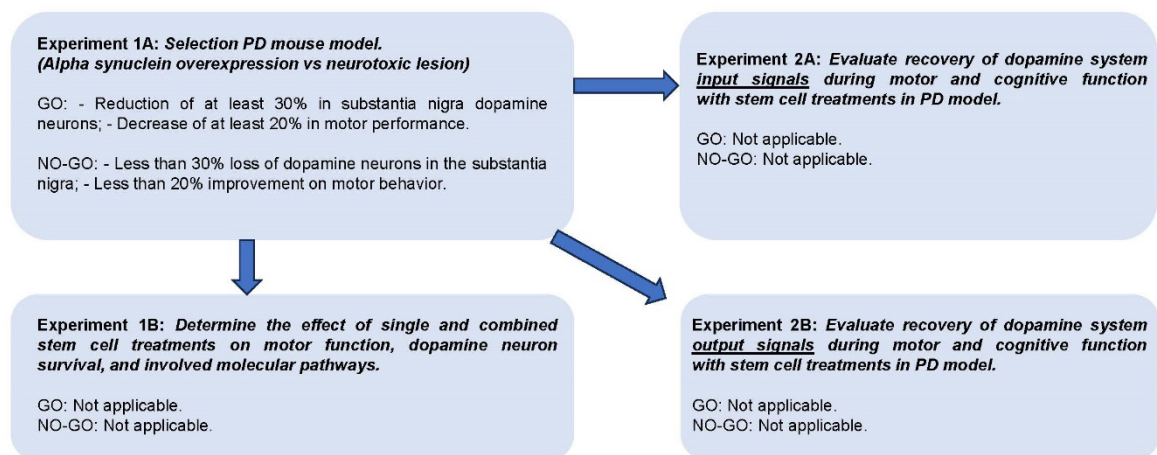


Fig.1: Overview of research aims that will be addressed in this project.

References

1. Kalia, L. V. & Lang, A. E. Parkinson's disease. *The Lancet* vol. 386 896–912 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3) (2015).
2. Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S. & Bloem, D. B. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's Disease* vol. 8 S3–S8 Preprint at <https://doi.org/10.3233/JPD-181474> (2018).
3. Sveinbjornsdottir, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem* **139**, 318–324 (2016).
4. Gerfen, C. R. & Surmeier, D. J. Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosci* **34**, 441–466 (2011).
5. Aarts, E., van Holstein, M. & Cools, R. Striatal Dopamine and the Interface between Motivation and Cognition. *Front Psychol* **2**, (2011).
6. Ip, C. W. *et al.* AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* **5**, 11 (2017).
7. Schneider, J. S. *et al.* GM1 Ganglioside Modifies α -Synuclein Toxicity and is Neuroprotective in a Rat α -Synuclein Model of Parkinson's Disease. *Sci Rep* **9**, 8362 (2019).
8. Chesselet, M.-F. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp Neurol* **209**, 22–7 (2008).
9. Song, L.-K. *et al.* Targeted Overexpression of α -Synuclein by rAAV2/1 Vectors Induces Progressive Nigrostriatal Degeneration and Increases Vulnerability to MPTP in Mouse. *PLoS One* **10**, e0131281 (2015).
10. Stefanis, L. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a009399 (2012).
11. Tieu, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a009316 (2011).
12. Masini, D. *et al.* A Guide to the Generation of a 6-Hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's Disease for the Study of Non-Motor Symptoms. *Biomedicines* **9**, 598 (2021).
13. Okitsu, M. *et al.* Mouse Model of Parkinson's Disease with Bilateral Dorsal Striatum Lesion with 6-Hydroxydopamine Exhibits Cognitive Apathy-like Behavior. *Int J Mol Sci* **25**, 7993 (2024).
14. Donega, V. *et al.* Intranasally administered mesenchymal stem cells promote a regenerative niche for repair of neonatal ischemic brain injury. *Exp Neurol* **261**, 53–64 (2014).
15. Donega, V. *et al.* Intranasal administration of human MSC for ischemic brain injury in the mouse: in vitro and in vivo neuroregenerative functions. *PLoS One* **9**, e112339 (2014).
16. Boukelmoune, N., Chiu, G. S., Kavelaars, A. & Heijnen, C. J. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to neural stem cells protects against the neurotoxic effects of cisplatin. *Acta Neuropathol Commun* **6**, 139 (2018).

17. Boukelmoune, N. *et al.* Nasal administration of mesenchymal stem cells reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice. *Brain Behav Immun* **93**, 43–54 (2021).
18. Donega, V. *et al.* Assessment of long-term safety and efficacy of intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain injury in the mouse. *Pediatr Res* **78**, 520–526 (2015).
19. Park, H. J., Shin, J. Y., Kim, H. N., Oh, S. H. & Lee, P. H. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells through autophagy modulation in a parkinsonian model. *Neurobiol Aging* **35**, 1920–1928 (2014).
20. Cerri, S. *et al.* Intracarotid Infusion of Mesenchymal Stem Cells in an Animal Model of Parkinson's Disease, Focusing on Cell Distribution and Neuroprotective and Behavioral Effects. *Stem Cells Transl Med* **4**, 1073–1085 (2015).
21. Weiss, M. L. *et al.* Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* **24**, 781–92 (2006).
22. Schiess, M. *et al.* Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Safety in Idiopathic Parkinson's Disease. *Movement Disorders* **36**, 1825–1834 (2021).
23. Ernst, A. & Frisén, J. Adult Neurogenesis in Humans- Common and Unique Traits in Mammals. *PLoS Biol* **13**, e1002045 (2015).
24. van den Berge, S. A. *et al.* The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain* **134**, 3249–3263 (2011).
25. Donega, V. *et al.* Transcriptome and proteome profiling of neural stem cells from the human subventricular zone in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* **7**, 84 (2019).
26. Leonard, B. W. *et al.* Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *Journal of Comparative Neurology* **515**, 269–294 (2009).
27. Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O. & Kokaia, Z. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* **29**, 4408–19 (2009).
28. Donega, V. *et al.* Single-cell profiling of human subventricular zone progenitors identifies SFRP1 as a target to re-activate progenitors. *Nat Commun* **13**, 1036 (2022).
29. Markowitz, J. E. *et al.* The Striatum Organizes 3D Behavior via Moment-to-Moment Action Selection Normal syllable sequence Lesion Syllable A. *Cell* (2018) doi:10.1016/j.cell.2018.04.019.
30. Wang, H. *et al.* A tool kit of highly selective and sensitive genetically encoded neuropeptide sensors. *Science (1979)* **382**, (2023).
31. Patriarchi, T. *et al.* Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science (1979)* (2018).
32. Callesen, M. B., Scheel-Krüger, J., Kringelbach, M. L. & Møller, A. A Systematic Review of Impulse Control Disorders in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* **3**, 105–138 (2013).
33. Dujardin, K. *et al.* The pattern of attentional deficits in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **19**, 300–305 (2013).
34. McGuigan, S. *et al.* Dopamine restores cognitive motivation in Parkinson's disease. *Brain* **142**, 719–732 (2019).
35. Cavanagh, J. F., Ryman, S. & Richardson, S. P. Cognitive control in Parkinson's disease. in 137–152 (2022). doi:10.1016/bs.pbr.2022.01.019.
36. Cachepe, R. & Cheer, J. F. Local control of striatal dopamine release. *Front Behav Neurosci* **8**, (2014).
37. Roberts, B. M., Lopes, E. F. & Cragg, S. J. Axonal Modulation of Striatal Dopamine Release by Local γ -Aminobutyric Acid (GABA) Signalling. *Cells* **10**, 709 (2021).
38. Montalban, E. *et al.* Translational profiling of mouse dopaminergic neurons reveals region-specific gene expression, exon usage, and striatal prostaglandin E2 modulatory effects. *Mol Psychiatry* (2022) doi:10.1038/s41380-022-01439-4.
39. Linders, L. E. *et al.* Stress-driven potentiation of lateral hypothalamic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons causes increased consumption of palatable food. *Nat Commun* **13**, (2022).
40. Rummelink, E., Chau, U., Smit, A. B., Verhage, M. & Loos, M. A one-week 5-choice serial reaction time task to measure impulsivity and attention in adult and adolescent mice. *Sci Rep* (2017) doi:10.1038/srep42519.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

In this study we seek to understand how stem cell treatments affect dynamics of the dopamine system during behavior. We cannot do this in human fMRI or PET studies, as both the temporal and also the spatial resolution of such approaches is insufficient. We also cannot do this in cell/organoid systems, as it is crucial to study neurophysiological processes during the behavioral performance in this study. Mouse models are a valid approach in this regard. Mice share with humans the evolutionarily well-conserved dopamine system (and basal ganglia circuit in which this is embedded). Mice are also capable of expressing the required motor as well as non-motor behavior, which are both affected in PD patients.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Molecular, cellular and functional analysis of the effects of stem cell treatment on dopamine circuit dynamics in PD.
2	Click or tap here to enter text.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	Click or tap here to enter text.	Molecular, cellular and functional analysis of the effects of stem cell treatment on dopamine circuit dynamics in PD

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design can be summarized as follows (also see Figure 1):

- In aim 1 we will perform:
 - Experiment 1A: Establish the PD model that we will use for the remainder of the project.
 - Experiment 1B: Establish how single treatment (mesenchymal stem cells [MSCs] *or* small molecule treatment [WAY]) versus combined treatment (MSCs *and* small molecule WAY) will improve motor function, dopamine neuron survival and repair, and associated affected molecular pathways, in the PD model.
- In aim 2 we will:
 - Experiment 2A: Establish how stem cell treatments (single and dual) affect the functioning of the dopamine system during motor and cognitive function in the PD model. In this experiment we focus on the extent to which dopamine input signals to the striatum are recovered.

- Experiment 2B: As in Experiment 2A. Except here we focus on the extent to which the stem cell treatments cause recovery of the activity patterns of the distinct neuronal subsets that occur in the striatum.

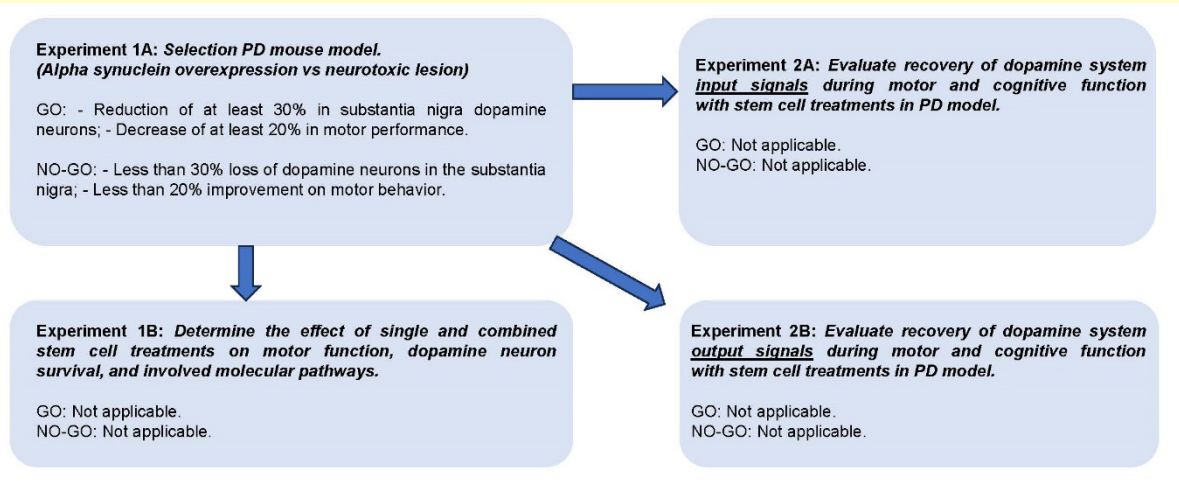


Figure 1: Overview of the experimental design at large.

Design and read-outs of Experiment 1A: Selecting PD model.

For Experiment 1A we compare two PD models. One in which alpha-synuclein is virally overexpressed into the dopamine system, and one in which a neurotoxic lesion (6OH-DA) is infused into the dopamine system. Both are commonly used preclinical models for PD (see project proposal). The experimental groups used are listed below (and are also mentioned in the project proposal text in more detail).

Exp group ID	PD model	Stereotaxic injection in the brain	Time point evaluated after injection	Primary read-outs
Exp 1A-Group 1	Alpha synuclein model	AAV control protein	8 weeks	1. Dopamine neuron survival. 2. Motor function.
Exp 1A-Group 2		AAV control protein	16 weeks	
Exp 1A-Group 3		AAV alpha synuclein	8 weeks	
Exp 1A-Group 4		AAV alpha synuclein	16 weeks	
Exp 1A-Group 5	6OH-DA model	Vehicle injection	3 weeks	
Exp 1A-Group 6		Vehicle injection	8 weeks	
Exp 1A-Group 7		6OH-DA injection	3 weeks	
Exp 1A-Group 8		6OH-DA injection	8 weeks	

The primary tests and read-outs are as follows for this experiment.

1. Dopamine neuron survival.

Survival and repair of dopaminergic neuron and of dopaminergic innervation will be determined by immunofluorescent staining for the dopaminergic marker (TH, tyrosine hydroxylase) and thymidine analogs (BrdU/EdU, labels newly born neural cells) followed by quantification of the number of dopaminergic neurons and the area of dopaminergic innervation in the midbrain and striatum.

Primary read-outs: TH-positive neuron count in midbrain, TH-positive fiber count in striatum.

2. Motor function. Mice will be tested on a battery of behavioural tests to assess motor function (for instance beam walking, grip strength test, rota-rod, voluntary explorative behaviour).
Primary read-outs: Depending on the exact test, but for instance: amount of rotations, locomotor activity.

Go/No/Go considerations regarding required effect sizes of the model are summarized in Figure 1, and will form the basis for selecting the right model for the rest of the experiments. Specifically, we will use that model and time point that gives a reduction of at least 30% in substantia nigra dopamine neurons, and that results in a concomitant significant decrease in motor function of at least 20%. The 6OH-DA model is highly likely to reach these benchmarks, as it is a potent neurotoxin. If an alpha-synuclein model also achieves these benchmarks we will prefer it over the 6OH-DA model, as the alpha-synuclein model, while likely having a lower effect size than 6OH-DA, does mimic the progressive aspect of PD more than the 6OH-DA does. The timeline of Experiment 1A is indicated in Figure 2.

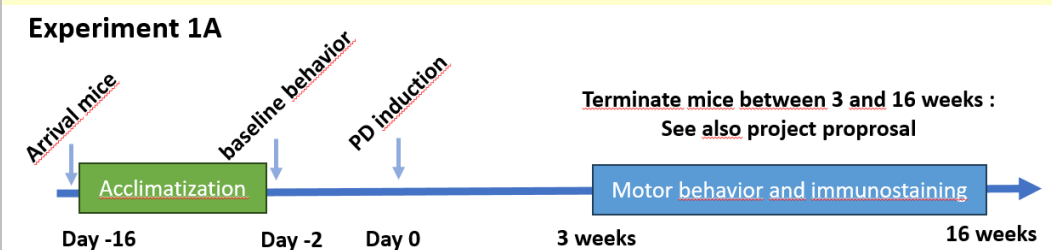


Figure 2: Timeline for Experiment 1A.

NB. Specific time points in this time line (Day -16 etc.) are given for a sense of context.

Reasonable variations in this timeline may occur when applying for a Work protocol (WP).

This will always be discussed with the AWB at moment of WP application.

Design and read-outs of Experiment 1B: Determining effects of single and combined stem cell treatments on motor function recovery, and on dopamine neuron survival, and the molecular pathways mediating the reparative effect.

In this experiment we will continue with the chosen PD model from experiment 1A. Using that model, we will establish the effects of intranasal mesenchymal stem cell (MSC) treatment, or i.p. small molecule treatment (WAY-316606, henceforth WAY), which stimulates proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells (NSCs) (██████████). We will also evaluate the effect of these two treatments combined. The experimental groups used are listed below (and are also mentioned in the project proposal text in more detail).

Exp group ID	PD induction	Stem cell treatment	Read-outs
Exp 1B-Group 1	No.	No	1. Dopamine neuron survival.
Exp 1B-Group 2		No	
Exp 1B-Group 3	Yes: Exp. 1A model.	MSCs only	2. Motor function.
Exp 1B-Group 4		WAY only	
Exp 1A-Group 5		MSCs and WAY	3. RNA analysis of affected pathways.

The primary read-outs for this experiment are:

1. Dopamine neuron survival or repair. To determine if the treatment promotes dopaminergic neuron survival or repair in the substantia nigra, and restores dopaminergic innervation of the striatum, mice will be administered thymidine analogs, which label newly born neural cells, and terminated after performing the behavioural tests and processed for further analysis. See also Exp 1A for description of the read-outs.
2. Motor function (see Exp 1A for description of tests and read-outs).
3. Molecular pathways affected.
We will assess molecular pathways involved in the underlying stem cell treatment effects. For that we will perform single nucleus RNA-sequencing (snRNAseq) on the dopaminergic system.
Primary read-outs: *Following unbiased cluster analyses we will focus on the inflammatory phenotype of microglia and astrocytes, and dopamine neuron subtypes and metabolic activation. Differential gene expression, gene ontology, and pathway analysis will be carried out.*

The timeline of Experiment 1B is indicated in Figure 3.

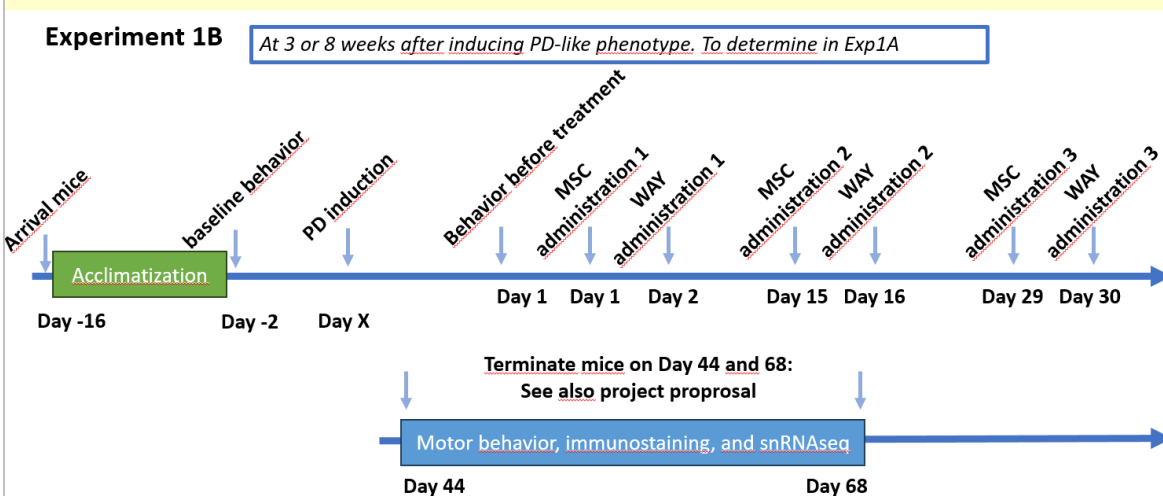


Figure 3: Timeline for Experiment 1B.

NB. Specific time points in this time line (Day -16 etc.) are given for a sense of context.

Reasonable variations in this timeline may occur when applying for a WP. This will always be discussed with the AWB at moment of WP application.

Design and read-outs of Experiment 2A: Evaluating the recovery of dopamine system *input signals* during motor and cognitive function after stem cell treatment in PD.

Here we will establish whether stem cell treatment can recover PD-induced impairment in dynamic dopamine release in the brain during motor and cognitive tasks. The experimental groups used are listed below (and are also mentioned in the project proposal text in more detail).

Exp group ID	PD induction	Stem cell treatment	Read-outs
Exp 2A-Group 1	No.	No	1. Task performance (cognitive task and motor task).
Exp 2A-Group 2	Yes: Exp. 1A model.	No	
Exp 2A-Group 3		MSCs only	2. Dopamine system activity in real-time during motor acts, and during cognition.
Exp 2A-Group 4		WAY only	
Exp 2A-Group 5		MSCs and WAY	

The primary read-outs for this experiment are:

1. Motor and Cognitive function: For motor function the same considerations apply as in Experiment 1A and 1B (see those for details). For cognitive function we use the self-paced 5 choice serial reaction time task (sp-5CSRTT). Here key elements of the task structure will be time-locked. Each mouse has their home-cage linked via a tunnel to the sp-5CSRTT for automatized, quick self-learning. Upon a trial start the mouse attends to five distinct window ports where a cue light can flash. Upon cue flashing in a hole, a nose poke must be made in that hole to obtain a food reward. Poking prematurely in a hole (premature response: impulsive action), poking in the wrong hole (incorrect: attentional dysfunction), not poking during the trial (omission: insufficient motivational drive) do not lead to reward and result in temporary time-out of the task. There are thus different types of trials that reflect different aspects of cognitive performance going right or wrong.
 - Correct trials, in which motivation for the task was correct, attention was correct, and impulse control was correct.
 - Omissions (insufficient motivational drive)
 - Incorrect responses (attentional dysfunction)
 - Premature responses (insufficient impulse control)

The primary read-outs will be the amount of trials of each subtype (correct, omission, incorrect, premature).
2. Dopamine input signals. Fiber photometry experiments will be performed to measure dopamine dynamics. These experiments involve stereotactic injection in the brain of an AAV to express a fluorescent-emitting dopamine biosensor. They also involve placement of an optic fiber above the region with the biosensor for real-time measurement of relative dopamine dynamics. The main read-outs will be the average differential fluorescence (dF) measured at the time of an event as compared to baseline (F). The resultant dF/F signal, which reflects changes in dopamine signals,

will be taken for key events such as:

- The initiation or termination of a motor action
- The initiation or termination of a cognitive performance (attention, impulse control, motivation),

The timeline of Experiment 2A is indicated in Figure 4.

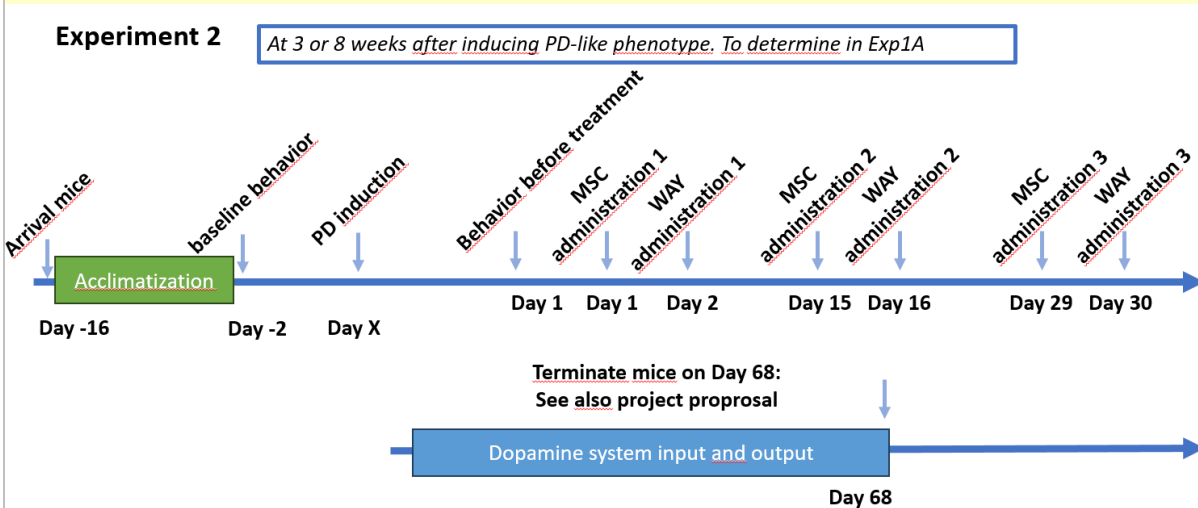


Figure 4: Timeline for Experiment 2A and 2B.

NB. Specific time points in this time line (Day -16 etc.) are given for a sense of context.

Reasonable variations in this timeline may occur when applying for a WP. This will always be discussed with the AWB at moment of WP application.

Experiment 2B: Determining the recovery of PD-impaired dopamine system *output* dynamics with stem cell treatment.

Dopamine is a neuromodulator that controls, in various ways, the activity levels of downstream circuits. Here we will evaluate these net consequences for distinct striatal neuronal types. For instance, in the striatum there are medium spiny neurons which express the dopamine 1 receptor (D1R), and others which express a dopamine 2 receptor (D2R). These two types of medium spiny neurons are considered to have different roles in behavioral processes (see project proposal). For these experimental groups we will therefore make use of transgenic mice which have reporter enzymes in D1R or D2R neurons (e.g. D1R-Cre or D2R-Cre mice). The experimental groups used are listed below (and are also mentioned in the project proposal text in more detail).

Exp group ID	PD induction	Stem cell treatment	Read-outs
Exp 2B-Group 1	No.	No	1. Task performance (cognitive task and motor task).
Exp 2B-Group 2	Yes: Exp. 1A model.	No	
Exp 2B-Group 3		MSCs only	2. Striatal D1R and D2R neuronal subgroup activity patterns in real-time during motor acts, and during cognition.
Exp 2B-Group 4		WAY only	
Exp 2B-Group 5	MSCs and WAY		

The primary read-outs for this experiment are:

1. Task performance: Same as for Experiment 2A. See there for details.
2. Activity levels of striatal neuronal subpopulations (D1R and D2R populations). The general approach is similar as in Experiment 2A. However, in this case instead of using a dopamine biosensor (which reports on relative dopamine levels) we here use calcium indicators in the striatal neuronal subpopulations which fluoresce as a function of intracellular calcium levels. This also yields a dF/F primary read-out (which in this case reflects neuronal activity). dF/F during relevant events will be measured, such as:
 - The initiation or termination of a motor action
 - The initiation or termination of a cognitive performance (attention, impulse control, motivation),

The timeline of Experiment 2B is indicated in Figure 4 (above).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Experiment 1A:

1. Stereotaxic surgery and intra-brain substance injection for PD induction.

For the alpha-synuclein overexpression model we perform a single surgery for the injection of an adeno associated virus (AAV) into the dopamine system of the brain. This surgery (operation and injection) will take maximally 1.5 hours. We do this in mice in mice at least 6 weeks old. This results in the overexpression of a mutated form of alpha-synuclein or control proteins in the dopamine system. For the 6OH-DA model the approach is in essence the same, it is a single stereotactic surgery of similar maximal length. However, in this case it results in the delivery of neurotoxin 6OH-DA (rather than alpha synuclein) in the dopamine system.

2. Motor function tests:

To assess functional improvement following intervention we will perform behavioural tests. Acclimatization of the mice to handling and the test-environment will enable us to obtain reliable baseline data with little variation. The types of behavioural tests that we will use will evaluate motor function. Examples of the types of test we will use are: pole test (this measures fine motor activity; control mouse is able to steadily hold onto the pole and descend it), open field (this is a test for general locomotor activity and anxiety: the mouse is placed in an arena with high walls; control mouse will actively explore this new environment), rotarod (motor assessment; control mouse is able to stay longer on the rotating rod), beam walking (this test also measures motor behaviour; control mouse will cross a narrow beam without difficulty). The mice will be exposed to maximally four tests over a time period of approximately 13 weeks maximum (16 weeks minus 3 weeks acclimatization, see Figure 2).

3. Anaesthetic overdose and transcranial perfusion. At the end of the experiment the mice are killed by means of anaesthetic overdose. A transcranial perfusion is performed for histological analysis.

Experiment 1B:

1. Stereotaxic surgery and intra-brain substance injection for PD induction. See Experiment 1A, though in this case it will be either AAV-alpha-synuclein or the neurotoxin 6OH-DA that is used to induce the PD state, depending on Experiment 1A outcomes.

2. Stem cell treatment interventions: To promote brain repair, substances such as WAY and MSCs will be administered to the mouse intermittently. To determine whether stem cell treatment stimulates repair of the dopamine system, we will administer BrdU and/or EdU. These are both thymidine analogs that label proliferating stem cells. Neuronal cells that express this label will be newly generated cells that have been produced after PD induction or stem cell treatment. Below we describe the volume, maximum frequency and duration of the planned interventions:

- a. BrdU - in drinking water (concentration: 1mg/mL in drinking water, frequency: constant, duration: max 2 weeks).
- b. EdU-intraperitoneal injection in the abdominal cavity (concentration: 50mg/kg, 50uL, frequency: 1x per day, duration: 4 weeks maximum).
- c. Treatment 1: MSCs or PBS (vehicle condition) – intranasally (volume: 16uL, frequency: maximum 1x per day, duration: maximum of three times)
- d. Treatment 2: WAY or PBS (vehicle condition) – intraperitoneal injection in the abdominal cavity (volume: 50uL, frequency maximum 1x per day, duration: maximum of three times).

3. Motor function tests: As Experiment 1A.

4. Anaesthetic overdose and transcardial perfusion. As Experiment 1A.

Experiment 2A and 2B (same steps):

1. Training mice in cognitive test.

Mice will be trained in the self-paced 5 choice serial reaction time task (sp-5CSRTT) (Rommelink et al., 2017) as described in the section above. Mice have access via their home cage through a tunnel to a behavioural apparatus in which mice need to wait for cue light onset prior to making a nose poke response in a specific port. They are solitarily housed for this until they reach an accuracy criterion. During this period that will maximally take 3 weeks. Those mice that do not reach criterion within 3 weeks would be taken out of the test (in our experience this does not happen, as all mice learn).

2. Stereotaxic surgery and intra-brain substance injection for PD induction. In a single stereotaxic brain surgery we will both:

- induce the PD state (same way as in Experiment 1B).
- inject the biosensor (for dopamine in Experiment 2A, and for calcium in Experiment 2B) into the dopamine system. We will also place an optic fiber over the injection site, and we will fix (for instance using a dental cement) the fiber in place.

Together this surgery will take maximally 2.5 hours.

3. Stem cell treatment interventions: As in Experiment 1B.
4. Fiber photometric recordings during motor and cognitive performance.
Motor and cognitive behavior is assessed whilst performing fiber photometry recordings. For this, mice are connected with their optic fiber to the fiber photometry system. Mice are not impeded in their movement by this. Recording sessions Will last a maximum of 2.5 hours and typically a maximum of 15 recordings per mouse would be made.
5. Anaesthetic overdose and transcranial perfusion. As in Experiment 1B.

References

- Cerri, S., Mus, L., & Blandini, F. (2019). Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis* 9(3):501-515. doi: 10.3233/JPD-191683.
- Donega, V., van der Geest, A. T., Sluijs, J. A., van Dijk, R. E., Wang, C. C., Basak, O., Pasterkamp, R. J., & Hol, E. M. (2022). Single-cell profiling of human subventricular zone progenitors identifies SFRP1 as a target to re-activate progenitors. *Nature Communications*, 13(1), 1036. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28626-9>
- Ip, C. W., Klaus, L.-C., Karikari, A. A., Visanji, N. P., Brotchie, J. M., Lang, A. E., Volkman, J., & Koprach, J. B. (2017). AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0416-x>
- Rommelink, E., Chau, U., Smit, A. B., Verhage, M., & Loos, M. (2017). A one-week 5-choice serial reaction time task to measure impulsivity and attention in adult and adolescent mice. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep42519>

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The number of mice will be kept to a minimum based on our extensive experience in performing both histological analysis and in vivo behavioural analysis and on a power analysis for the different parameters measured. In general for our experiments we expect an $\alpha = 0.05$, a power of 0.8. Based on this we used a group size of 20/group for the calculation of the number of mice in this project. Specific power calculations depend on the exact experiment at hand. The AWB and statisticians will always be consulted prior for a specific WP for a specific power calculation.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mus musculus	Own breeding facility or ordered from approved breeders	Adolescent / Adult	864 mice	Male and female	No.	C57B6J

2	Mus musculus	Own breeding facility or ordered from approved breeders	Adolescent / Adult	480 mice	Male and female	Yes	Transgenic mice (Cre/FLP lines) on C57B6J background.
---	--------------	---------------------------------------------------------	--------------------	----------	-----------------	-----	-------------------------------------------------------

Provide justifications for these choices

Species	Mice have a dopamine system, are capable of motor and non-motor cognitive behavior, and the effect of (stem cell) interventions can be mechanistically tested in mice. Moreover, in mice there is a large abundance of transgenic lines which allow for specific recordings/targeting of specific neuronal subsets (e.g. certain striatal populations).
Origin	Own breeding facility or ordered from approved breeders
Life stages	Adolescent-adult. Typical disease onset is in adulthood. Stereotaxic injections may occur during adolescence (typically >6 weeks, >20 grams, and <5 months), but then incubation periods for effect onsets will take several weeks/months. Relevant life phases during which experiments take place thus tend to be in the range of 1.5 – 8 months.
Number	<p>See section A for the explanation for specific experiments. Typically for the experiments with power of at least 0.8 and alpha 0.05 we need group (condition) sizes of 20. We estimate that maximally 15% of mice would need to be excluded on the basis of incorrect injections sites or possible non-recovery from surgery. That is why here we will reason from a $N=20/0.85=24$ mice per group. Note that more elaborate power analyses would be provided for specific work protocols, when consulting both AWB and a statistician. Here we provide reasonable upper limits of needed mice.</p> <p>For Aim 1 experiments, we need: <u>Exp 1A:</u> 8 Exp conditions x 2 sexes x 24 mice/group = 384 mice (24/group). <u>Exp 1B:</u> 5 Exp conditions x 2 sexes x 24 mice/group = 240 mice (24/group).</p> <p>For Aim 2 experiments, we need: <u>Exp 2A:</u> 5 Exp conditions x 2 sexes x 24 mice/group = 240 mice (24/group). <u>Exp 2B:</u> 5 Exp conditions x 2 sexes x 2 neural subpopulations x 24 mice/group = 480 mice (24/group).</p> <p>Total = 384 + 240 + 240 + 480 = 1344 mice.</p> <p>Distributions: <i>Male vs Female:</i> Of these we expect 50% to be male and 50% to be female.</p> <p><i>Wild type - Transgenics:</i> In Exp 2B we use Cre/FLP lines to be able to target the two distinct neural populations. So 864 wild type and 480 transgenic mice (~36% of total).</p>
Gender	Male and Female mice as Parkinson's disease occurs in people from both sexes, but the type of symptoms can show variations to some extent. For instance in terms of attention, impulse control, and movement (Cerri et al., 2019). Moreover, effects of

	treatments on motor and on non-motor symptoms can differ between the sexes (Cerri et al., 2019). Therefore we seek to investigate here both male and female mice.
Genetic alterations	Both wild type and transgenic lines. Transgenic lines only when there is need to specifically express certain proteins in specific neuronal populations (see below).
Strain	C57B6J mice for WT; transgenic lines would be Cre or Flp lines (on C57B6J background) to target specific populations of neurons with biosensor approaches. For instance Dopamine 1 receptor Cre or FLP lines, and Dopamine 2 receptor Cre of FLP lines.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

In Experiments 2A and 2B: To train the mice in the self-paced 5 choice serial reaction time task, in order to be able to assess cognitive symptoms, the mice are temporarily solitarily housed. Such that specific task performance can be linked to a specific mouse. Training typically takes less than 3 weeks (if it would take more we would take the mouse out of the study). Mice are in this case solitarily housed, but in a room with multiple mice in such training conditions (so not alone in a room). After training the mice will be rejoined with former cage mates. During behavioral testing later on for cognitive performance mice will again be placed back on occasion in this same task for maximally 15 recordings. For each recording they would maximally spend 3 days again in the solitary set-up before being rejoined with former cage mates.

Aside from these housing conditions in Experiment 2A and 2B, the housing and care is in accordance with the Annex.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

For surgical procedures anaesthetics and pain killers will be given prior to the surgical procedure. Pain killers will also be given following the surgical procedure.

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

The induction of PD will result in discomfort to the mice. We expect a mortality rate of 10% of mice for this procedure.

Explain why these effects may emerge.

The induction of PD involves discomfort as it mimics Parkinson's disease. This discomfort primarily consists of difficulties in movement for example losing balance, and slower locomotion. Also weight loss could be expected. Administration of Brdu/EdU can lead to some fur loss after prolonged administration (more than four weeks of administration).

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Following induction of PD, mice will be housed in groups when possible. They will also receive recovery food (already prior to the procedure to prevent neophobia) during the induction of PD when needed as the weight of the mice will be carefully monitored. We will minimize the suffering prior to the surgery by applying a local anesthetic in combination with general anesthesia. Following surgery the mice will receive pain killers and will be placed on a heating plate to recover. The surviving mice will be carefully monitored, if measures to reduce discomfort such as recovery food are not successful we will sacrifice the mice.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

If following PD induction some mice show signs of pain that do not relate to the disease we will terminate them. The first week after PD induction the mice will be monitored daily for signs of discomfort and a score list will be filled on a daily basis. This score list includes: weight, piloerection, breathing, fur condition, and mobility. The mice will be killed when a pre-defined score is reached. The score and humane endpoint will be defined when applying for the work protocol in consultation with the AWB. After the first week following PD induction, mice will be checked three times a week and will be monitored for signs of discomfort. The same score list will be used (Figure 5). A humane endpoint is also reached when the animals lose body weight of over 15% in 2 days during the entire duration of the experiment (Figure 5). In case the clinical signs reflect the symptoms of PD disease, which we aim to mimic in a mouse model, we will take steps to reduce the pain and discomfort by giving analgesics, housing the mice in groups as much as possible, providing soft chow, warm pads and cage enrichment.

Score lijst na MPTP injectie	Dag 0	Dag1	Dag2
Gewicht (in gram < 15% op dag 0)			
Piloerectie			
Mobiliteit			
Ademhaling			
Vachtconditie			

Scores van 0-2 worden gebruikt. 0= geen bijzonderheden.

Verandering in gewicht van 15% = score 1; >15% = score 2

Ademhaling: snelle ademhaling 24u = score 1; snelle ademhaling 48u = score 2

Activiteit: niet reageren bij oppakken kooi =score 1; niet reageren bij aantikken kooi na 48u = score 2

Bij een score van 1-2 wordt er gelijk actie ondernomen: bv. Weekvoer, pijnstiller carprofen, warmte pad. Muis wordt dan extra (2 keer per dag) gecontroleerd. Als het na 2 dagen niet beter is geworden wordt er in consultatie met dierversorger besloten om i) behandeling aan te passen, ii) behandeling langer door te laten gaan of iii) muis wordt afgevoerd.

Bij een score van 2 of meer wordt de muis gelijk afgevoerd.

Figure 5. Example of a possible HEP score list that can be used following PD induction. A new score list will be made when applying for a WP. This will always be discussed with the AWB at moment of WP application.

Indicate the likely incidence.

We expect an overall mortality rate of 10-15%, due to factors like brain surgery and PD induction.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Exp	Group (NB. Males [M] AND Females [F] are separate subgroups of 24/each)	Experimental actions and discomfort	Total # of mice	Total discomfort
	Exp 1A-Group 1	<ul style="list-style-type: none"> Acclimatization - mild 		

1A		<ul style="list-style-type: none"> • Behavioral tests - mild • Control condition of PD (alpha-synuclein) - moderate • Behavioral tests - mild • Transcardial perfusion - non-recovery 	48 (24M, 24F)	moderate
	Exp 1A-Group 2	<i>As Exp 1A-Group 1 (but longer waiting time)</i>	48 (24M, 24F)	moderate
	Exp 1A-Group 3	<ul style="list-style-type: none"> • Acclimatization - mild • Behavioral tests - mild • PD induction alpha-synuclein severe • Behavioral tests – mild • Transcardial perfusion - non-recovery 	48 (24M, 24F)	severe
	Exp 1A-Group 4	<i>As Exp 1A-Group 3 (but longer waiting time)</i>	48 (24M, 24F)	severe
	Exp 1A-Group 5	<i>As Exp 1A-Group 1, but control for 6OH-DA infusion</i>	48 (24M, 24F)	moderate
	Exp 1A-Group 6	<i>As Exp 1A-Group 5 (but longer waiting time)</i>	48 (24M, 24F)	moderate
	Exp 1A-Group 7	<i>As Exp 1A-Group 3 (but 6OH-DA instead of alpha-synuclein)</i>	48 (24M, 24F)	severe
	Exp 1A-Group 8	<i>As Exp 1A-Group 8 (but longer waiting time).</i>	48 (24M, 24F)	severe
	Experiment 1A: Total of 384 mice.			
= Moderate discomfort: 192 mice (50%)				
= Severe discomfort: 192 mice (50%)				
Exp	Group (NB. Males [M] AND Females [F] are separate subgroups of 24/each)	Experimental actions and discomfort	Total # of mice	Total discomfort
1B	Exp 1B-Group 1	<ul style="list-style-type: none"> • Acclimatization - mild • Behavioral tests - mild • PD: Control condition – moderate • Stem cells: Control condition for intranasal MSCs and i.p. WAY – mild • Administration of BrdU (drinking water) and EdU (i.p.) - moderate • Behavioral tests – mild • Transcardial perfusion - terminal 	48 (24M, 24F)	moderate
	Exp 1B-Group 2	<i>As Exp 1B-Group 1 (but with actual PD induction – severe, control for stem cell treatment)</i>	48 (24M, 24F)	severe

	Exp 1B-Group 3	<i>As Exp 1B-Group 2, but with a stem cell treatment (in itself mild).</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
	Exp 1B-Group 4	<i>As Exp 1B-Group 2, but with a stem cell treatment (in itself mild).</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
	Exp 1B-Group 5	<i>As Exp 1B-Group 2, but with both stem cell treatments (both mild).</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
Experiment 1B: Total of 240 mice.				
= Moderate discomfort: 48 mice (20%)				
Severe discomfort: 192 mice (80%)				
Exp	Group	Experimental actions and discomfort	Total # of mice	Total discomfort
2A	Exp 2A-Group 1	<ul style="list-style-type: none"> • Acclimatization - mild • Behavioral training - mild • Stereotaxic surgery for induction of PD (Control condition) – moderate. • (Same) stereotaxic surgery for infusion of biosensor and placement optic fiber. - moderate • Stem cells: Control condition for intranasal MSCs and i.p. WAY - mild • Behavioral tests with photometric recordings– mild • Transcardial perfusion - terminal 	48 (24M, 24F)	moderate
	Exp 2A-Group 2	<i>As Exp 2A-Group 1 (but with actual PD induction – severe)</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
	Exp 2A-Group 3	<i>As Exp 2A-Group 2, but with a stem cell treatment (in itself mild).</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
	Exp 2A-Group 4	<i>As Exp 2A-Group 2, but with stem cell treatment (in itself mild).</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
	Exp 2A-Group 5	<i>As Exp 2A-Group 2, but with both stem cell treatments (both mild).</i>	48 (24M, 24F)	<i>severe</i>
Experiment 2A: Total of 240 mice.				
= Moderate discomfort: 48 mice (20%)				
= Severe discomfort: 192 mice (80%)				
Exp	Group	Experimental actions and discomfort	Total # of mice	Total discomfort
	Exp 2B-Group 1	<ul style="list-style-type: none"> • Acclimatization - mild • Behavioral training - mild • Stereotaxic surgery for induction of PD (Control condition) – moderate. • (Same) stereotaxic surgery for infusion of biosensor and placement optic fiber. - moderate • Stem cells: Control condition for intranasal MSCs and i.p. WAY - mild 	Striatal population 1: 48 (24M, 24F) Striatal population 2: 48 (24M, 24F)	<i>Moderate</i>

2B		<ul style="list-style-type: none"> Behavioral tests with photometric recordings– mild Transcardial perfusion - terminal 	Total: 96 (48M, 48F)	
	Exp 2A-Group 2	<i>As Exp 2B-Group 1 (but with actual PD induction – severe)</i>	Total: 96 (48M, 48F)	<i>Severe</i>
	Exp 2A-Group 3	<i>As Exp 2B-Group 2, but with one stem cell treatment (in itself mild).</i>	Total: 96 (48M, 48F)	<i>Severe</i>
	Exp 2A-Group 4	<i>As Exp 2B-Group 2, but with a stem cell treatment (in itself mild).</i>	Total: 96 (48M, 48F)	<i>Severe</i>
	Exp 2A-Group 5	<i>As Exp 2B-Group 2, but with both stem cell treatments (both mild).</i>	Total: 96 (48M, 48F)	<i>Severe</i>
Experiment 2B: Total of 480 mice.				
- Moderate discomfort: 96 mice (20%)				
- Severe discomfort: 384 mice (80%)				
GRAND TOTAL: Total of 84 + 240 + 240 + 480 = 1344 mice				
- Moderate discomfort: 192 + 48 + 48 + 96 = 384 (=28.6%)				
- Severe discomfort: 192 + 192 + 192 + 384 = 960 (=71.4%)				

For Experiment 1B, 2A and 2B it is our expectation that at least one of the stem cell treatment groups (Group 3, 4 and/or 5) would have less discomfort from the PD induction due to the stem cell treatment. Their discomfort will therefore be expected to be less in an absolute sense than in the PD no-treatment groups. However, PD treatment typically only starts when dopamine system damage and symptoms have already occurred. Therefore also in this design we first induce the PD state and then start treatment. Therefore, since a PD state does first occur prior to treatment, we have still classified the discomfort of Groups 3-5 as severe.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	Studies in mice are still necessary to investigate approaches to promote brain repair to assess its restorative effects on motor and cognitive behaviour. We will combine molecular and cellular data with behavioural read-outs. There are no replacements available for our proposed mice experiments, i.e. at this moment there is no alternative to measure cognitive and motor recovery <i>in vivo</i> . The development of brain organoids that faithfully reflect the brain is still ongoing. Brain organoids would not be a suitable alternative as this technique does not yet allow studying a fully mature and “adult”-like brain, it does not recapitulate all the complexity of a brain and it is not possible to assess behavioural improvement following intervention. Human post-mortem studies do not allow for determining the cellular effects of treatment in a functioning system. Human brain scan approaches do not have the resolution to assess cellular/network level changes during real-time behavior.
Reduction	We use two well-established mouse models of PD, and will start by comparing between the two which one is most suitable for the rest of the project. This approach contributes to robust and reproducible results. Where possible, litters of mice will be shared between researchers to decrease “breeding surplus” mice. Both male and female mice will be used, which reduces unnecessary breeding of mice (as this way

	the entire litter is eligible for use instead of just half). We perform power analyses to determine the minimal number of mice necessary for each experiment.
Refinement	The PD mouse model we will choose (after comparing two established models) will result in robust Parkinson's disease phenotype, namely the degeneration of dopaminergic neurons and the behavioral symptoms, such as motor and cognitive impairment. The cognitive tests we perform involve self-training of the animals on the apparatus, limiting stress of the animals. Transgenic mice are used to increase the precision of measurements (e.g. measuring of selective sets of neurons in the striatum, rather than the whole collective with potentially opposite response profiles). We are also in collaboration with researchers in Amsterdam who are setting-up in parallel to us a similar mutated alpha-synuclein overexpression mouse model, however, they are using a different administration route, namely through orbital injection. In case their approach is successful as defined by our GO/NO-GO criteria we will use their method instead as it would reduce discomfort to the animals.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

Click or tap here to enter text.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

Click or tap here to enter text.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Click or tap here to enter text.

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Click or tap here to enter text.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

For the collection of tissue, which is necessary for analyzing the data and assessing efficacy of the treatment. Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Click or tap here to enter text.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Mice will be killed by an overdose of pentobarbital.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Click or tap here to enter text.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Not applicable.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202418519
2. Titel van het project : Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during PD motor and non-motor behaviours
3. Titel van de NTS : Effecten van stamceltherapie op breinherstel voor bewegingsproblemen en cognitieve symptomen bij de ziekte van Parkinson

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 29-11-2024
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 04-12-2024 en 05-02-2025
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot: 10-12-2024 / 28-01-2025
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 13-02-2025

7. De aanvraag is afgestemd met de lvD en deze is hiermee akkoord. De herziene versie is niet afgestemd met de lvD.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 04-12-2024
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 4
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker + (online) collega
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de doelen, de te gebruiken modellen, de technieken en het ongerief. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 10-12-2024
- Datum antwoord: 28-01-2025
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Vragen:

De DEC heeft uw projectaanvraag en NTS op 4 december 2024 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen:

Wij willen ten eerste graag noemen dat er in de wisselwerking tussen ons en IVD bij de voorbereiding van de aanvraag zoals ingediend voor de vergadering van 4-12-2024 een probleem is ontstaan in het opschonen van de track changes in het document. Als gevolg daarvan heeft uw commissie uiteindelijk helaas een versie gekregen waarin de leesbaarheid van sommige zinnen en delen bemoeilijkt was (want met deels wel/deels niet geaccepteerde track changes in het document).

Dat dit het geval was werd ons als indieners helaas pas duidelijk richting het eind van de commissievergadering (op basis van enkele vragen over zinsneden waarvan wij als aanvragers vermoedden dat ze niet in de laatste versie meer stonden). Wij hebben direct na afloop van de DEC vergadering contact met de IvD en met het DEC-secretariaat gezocht, en daardoor werd dit vermoeden bevestigd. We hebben toen de IvD gevraagd om opnieuw het document op te schonen, en zodoende heeft de IvD op 4-12-2024 na de vergadering nog de correcte documenten nagestuurd naar het DEC secretariaat.

Wij vermoeden dat in ieder geval een deel van de ontstane vragen en onduidelijkheden voor de commissie hun oorsprong vindt in dit onfortuinlijk misverstand. Bij onze herindiening gaan we uit van de gecorrigeerde stukken als basis (ipv de versie die de DEC in eerste instantie ontving). In die gecorrigeerde versie geven we groen gearceerd aan welke toevoegingen zijn gemaakt en welke delen van tekst, eerder wellicht minder makkelijk leesbaar, direct aangrijpen op gestelde vragen.

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond: Kunt u aangeven welk 'nieuw puzzelstukje' u wilt onderzoeken in de gehele complexe puzzel met betrekking tot de ziekte van Parkinson en de behandeling daarvan (uit uw mondelinge toelichting lijkt dat vooral de combinatie van het toedienen van stamcellen met neuronale groeifactoren)?

Inderdaad, wij willen graag onderzoeken of er, in een muismodel voor de ziekte van Parkinson, meer positief effect is op motorische en cognitieve symptomen wanneer we twee verschillende soorten stamcelbehandelingen combineren. Iets dat nog niet eerder is gedaan in deze context. De behandelingen zijn als volgt:

- 1. Mesenchymale stamcellen (MSCs). Deze stamcellen worden zelf (doorgaans) geen nieuwe neuronen, maar kunnen wel bevorderlijk zijn voor de overleving van (nieuwe) neuronen, onder andere door hun anti-inflammatoire werking.*
- 2. Een zogenaamd small molecule (WAY), dat de Wnt pathway stimuleert, en daarmee de aanmaak van lichaamseigen neurale stamcellen (NSCs) stimuleert.*

Onze hypothese is dat deze combinatie-behandeling additief of zelfs synergistisch positieve effecten heeft t.o.v. een behandeling met slechts een stamcelmethode; en dat het daarmee op den duur de potentie heeft om als een verbeterde therapie voor Parkinson te dienen vergeleken

met huidige (enkelvoudige) stamcelstrategieën die in opkomst zijn.

Van belang is verder dat we kijken naar zowel motorische deficiëten, maar ook de veel minder bestudeerde doch belangrijke non-motor (cognitieve) symptomen. Daarnaast kijken we echt naar het functioneel herstel van het dopamine systeem tijdens gedrag, in plaats van alleen de globalere anatomische intactheid van het systeem (gangbaar). Ook onderzoeken we de mechanismen waarlangs de therapie werkbaar kan zijn (door middel van single-nucleus RNA sequencing en immunofluorescente kleuringen).

Indien de combinatietherapie beter werkt dan enkelvoudige strategieën, en we de werkingsmechanismen snappen, is dat een potentieel baanbrekende bevinding die ook relevant zal zijn voor alle andere neurodegeneratieve ziektes en hersentrauma waar neuronale cellen dood gaan en met stamcel therapie hersteld zouden kunnen worden.

U heeft toegelicht dat er geen eenduidige primaire oorzaak van Parkinson is, maar dat het altijd convergeert op de dood van dopamine cellen. Daarmee heeft u beargumenteerd dat u de beschreven modellen (t.a.v. dopamineverlies) bestudeert en niet direct op zoek bent naar onderliggende oorzaken. De DEC begrijpt deze zienswijze, maar mist nog een inbedding van deze keuze in het grotere geheel van 'de puzzel van Parkinson. Kunt u dit uitgebreider toevoegen in de aanvraag?

In de nieuwe versie van de aanvraag hebben we dit nu uitgebreider besproken.

U bent, ondanks de beschikbare literatuur, nog niet overtuigd van het meest geschikte model voor uw project. Daarom wilt u eerst onderzoek doen naar het alpha-synucleïne model en het 6OH-DA model om vervolgens een keuze te maken. Kunt u de keuze voor deze twee modellen kort toelichten? En kunt daarbij de huidige wetenschappelijke stand van zaken weergeven?

In de nieuwe versie van de aanvraag hebben we dit nu uitgebreider besproken.

Is het nodig, om in het huidige stadium van kennis over stamcellen, al dan niet in combinatie met small molecules, te kijken naar het non-motor effect? Waarom onderzoekt u niet eerst het motor effect om na een go/no go moment verder onderzoek te doen naar de non-motor effects?

Het is inderdaad o.i. belangrijk om zowel de motor en cognitieve (non-motor) symptomen parallel te bestuderen. Om twee primaire redenen:

1. Onze huidige kennis over de effect van stamcel behandeling in non-motor symptomen is zeer beperkt. Parkinson patiënten geven vaak aan dat de non-motor symptomen net zo beperkend zijn als de motorische symptomen. Deze symptomen uit zich in de prodromale fase van de ziekte en hebben een groot effect op het leven van patiënten en hun naasten. Non-motor symptomen zijn dus cruciaal in de ziekte, maar studies die ze evalueren zijn relatief ondervertegenwoordigd.

2. Daarnaast is het zowel gedragsmatig als neurobiologisch gezien zo dat de motorische en non-motorische symptomen ten minste gedeeltelijk gedissocieerd zijn. Tevens is het zo dat een behandeling beter kan aanslaan op het ene soort symptoom dan op het andere. Als de hier bestudeerde behandelingen meer zouden aanslaan op non-motor symptomen dan op motor symptomen is dat zeer belangrijk om te weten (en indien we het via een go/no-go moment zouden structureren zouden we deze eventuele belangrijke uitkomst mogelijk missen).

dopaminerge input signaal voor deze neuronens deels weg, maar vindt er ook daarmee een algehele verandering (plasticiteit) plaats in de activiteitsniveau's van deze twee soorten medium spiny neuronens. Het is belangrijk te weten of de stamcelbehandelingen die we gaan testen het dopamine inputsignaal voor deze twee verschillende celtypes corrigeert, maar het is eveneens belangrijk om te begrijpen of daarmee ook daadwerkelijk de gecreeerde disbalans in activiteit van medium spiny neuronens met dopamine 1 of dopamine 2 receptoren is hersteld.

Het is niet wenselijk om dit alleen op gedragsniveau uit te proberen te lezen zonder rekening te houden met de neurofysiologie. Indien er positieve gedragseffecten zouden zijn, zouden we mechanistisch willen aantonen dat deze daadwerkelijk ontstaan door functioneel herstel van het dopamine systeem. Indien er geen, of slechts gedeeltelijk positieve gedragseffecten zouden zijn, zou het belangrijk zijn om neurofysiologisch te begrijpen waarom dat zo is. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat de stamcelbehandeling heel goed in staat is het dopamine input signaal te corrigeren, maar niet de medium spiny neuron disbalans herstelt. Dat zou dan tot ander soort vervolgonderzoek leiden dan bij andere neurofysiologische uitkomsten. Kortom, in alle gevallen zijn de neurofysiologische inzichten belangrijk om de gedragsmatige te kunnen duiden. We hebben hier nu meer over geschreven in de aanvraag (sectie 3.4).

Kunt u de literatuurverwijzingen / referenties controleren en waar nodig aanpassen?

Dit hebben we gecontroleerd en aangepast waar nodig. Eerdere problemen hiermee lijken verband te houden met eerdergenoemde problemen tijdens de "track changes opschoonfase".

3.4 Strategie: De DEC mist hypothesen en een argumentatie van welke molecular pathways er met RNA seq worden onderzocht. Kunt u beter onderbouwen hoe de uitkomsten van het project bijdragen aan een verbeterde uitgangssituatie voor stamceltherapie bij mensen? Naast het bepalen van de effectiviteit van de stamcel behandeling is het begrijpen van de werkingsmechanismen van de behandeling ook belangrijk, omdat dit zal helpen bij eventuele optimalisaties van de therapie, translatie naar de mens, en het mogelijk maken om het breder in te zetten voor ook andere neurodegeneratieve ziektes en hersenschade.

Zoals (nu explicieter) vermeld in de aanvraag is een van de veronderstelde werkingsmechanismes van MSCs dat ze anti-inflammatoir zijn, daar waar van de small molecule behandeling geacht wordt juist primair werkzaam te zijn via stimulatie van lichaamseigen NSCs.

Met RNAseq kunnen we daadwerkelijk kijken of dit inderdaad betrokken moleculaire pathways zijn bij de behandeling. Zo gaan we kijken naar ontstekingspathways zoals in de aanvraag genoemd, en ook naar pathways betrokken bij de productie van nieuwe neuronale cellen, en neuroprotectie (bijvoorbeeld worden microglia cellen meer ondersteunend, neuroprotectief in plaats van pro-inflammatoir?). We hebben hier nu meer over geschreven in de aanvraag.

Bijlage

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC ziet dat enkele cognitieve taken (o.a. de 5choice) ook een sterk motorisch aspect heeft: een betere beweging beïnvloedt het kunnen uitvoeren van de taak (schakelen tussen beloning en stimulus aanraken) en dus de cognitie. In het licht van uw onderzoek naar Parkinson, is een cognitieve taak die sterk afhankelijk is van de motoriek dan een juiste keuze?

De motorische effecten zijn niet zodanig heftig dat de dieren niet meer in staat zijn te bewegen. Ze kunnen de taak nog steeds uitvoeren. We kunnen in de 5 choice makkelijk corrigeren voor het aantal uitgevoerde trials, voor zover dat beïnvloed is door de Parkinsoniaanse staat, en de focus leggen op de percentages van correcte, incorrecte, premature responsen en van omissies. Het zijn vooral die percentuele verdelingen, ipv totale aantallen, van uitkomsttypes die informatief zijn voor het cognitieve vermogen van het dier.

B. De dieren: U geeft aan mannelijke en vrouwelijke muizen te gebruiken en in de uitwerking blijkt dat u alle (!) experimenten zowel op mannelijke als op vrouwelijke dieren gaat uitvoeren. Waarom dat nodig is én wat ermee beoogd wordt staat niet in de aanvraag. Wilt u binnen deze aanvraag ook seksueel dimorfe aspecten van *stamceltherapie* bestuderen en indien dat zo is de reden toelichten? Is het eventueel mogelijk alle experimenten op alleen mannelijke dieren (als model voor PD) uit te voeren en een beperkt aantal experimenten ook op vrouwelijke dieren?

*Dit is een zeer belangrijk aspect. De ziekte van Parkinson komt uiteraard zowel in mannen als vrouwen voor. De motorische en cognitieve symptomen kunnen echter op een seksafhankelijke manier variëren in termen van intensiteit en frequentie. Daarnaast kunnen ook behandelmethodes verschillen in hun effectiviteit voor zowel cognitieve als motorische symptomen, tussen mannen en vrouwen (Cerri et al., 2019; PMID: **31282427**).*

In onderzoek wordt er relatief te vaak nog alleen gekeken naar mannetjes (muizen), met mogelijke negatieve consequenties voor vertaalbaarheid naar de (vrouwelijke) patient. Daarom willen wij inderdaad kijken of de therapie net zo effectief is in mannelijke als vrouwelijke muizen. Gelukkig is er ook een onderzoek nu wel steeds vaker de tendens dat ook data in vrouwtjes muizen noodzakelijk is wanneer er naar behandelmethodes wordt gekeken. Om bovenstaande redenen vinden wij het belangrijk dit onderzoek in zowel vrouwtjes als mannetjes uit te kunnen voeren. Wij hebben dit nu toegelicht in de aanvraag.

By 3R geeft u aan: "Both male and female mice will be used, which reduces unnecessary breeding of mice." Dat lijkt niet echt van toepassing omdat u de effecten op beide seksen afzonderlijk gaat bestuderen. Wilt u dit nagaan?

We hebben nu verduidelijkt dat we hiermee bedoelen dat dit een fokoverschot vermindert (in termen van welke proportie van een fok daadwerkelijk experimenteel bruikbaar is). Want in principe zijn hierdoor gefokte dieren voor dit project experimenteel nuttig ongeacht of het mannetjes of vrouwtjes zijn.

Kunt u aangeven of volgens u het ernstig ongerief met name veroorzaakt wordt door het modeleren van Parkinson of gaat het om een optelling van de handelingen?

Ernstig ongerief wordt voornamelijk veroorzaakt door de verwachte verminderde motoriek van de dieren.

Wilt u overwegen de berekende groepsgrootte (n=20) bij de berekening direct te corrigeren voor de 15% uitval (n=20/0,85 --> 24)? Dat voorkomt veel ingewikkelde tekst over afronding van groepsgrootte later in de tabel.

Akkoord, wij hebben dit nu gedaan.

Hoe voorkomt u dat langer durend ongerief 'zeer ernstig' wordt? Bij zeer ernstig ongerief is een ontheffing noodzakelijk.

Wij gebruiken een HEP score lijst, een voorbeeld is toegevoegd aan de bijlage. Wij zullen de muizen gedurende de eerste week na inductie van Parkinson symptomen dagelijks monitoren. Na de eerste week zullen de muizen drie keer per week gemonitord worden. De muizen zullen worden afgemaakt als de HEP bereikt wordt. Door de HEP score lijst te gebruiken kunnen wij voorkomen dat er muizen zijn met zeer ernstig ongerief.

Niet Technische Samenvatting

Kunt u in de NTS opnemen door welke handelingen het cumulatief ongerief ontstaat en daar steeds het ongerief bij vermelden?

Akkoord, dit hebben we nu vermeld.

Wilt u de term 'motorsymptoom' vervangen voor een gangbare term (b.v. beweging)?

Akkoord, dit hebben we nu vermeld.

Wilt u kort toelichten wat een muismodel is?

Akkoord, dit hebben we nu vermeld.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Bij de ziekte van Parkinson (PD) is het dopaminesysteem in de hersenen beschadigd. Het betreft een ernstige progressieve ziekte waarbij de patiënt langdurig (motorische en cognitieve) klachten heeft. De aandoening is complex, multifactorieel en ongeneeslijk. Dit onderzoek is niet gericht op de primaire oorzaak of preventie van PD, maar op nieuwe mogelijkheden om het dopaminerge systeem te herstellen. Men wil daarom het effect van een gecombineerde stamcelbehandeling op het functioneren van het dopamine-circuit en op motorisch en niet-motorisch gedrag onderzoeken in muizen waarin Parkinson is geïnduceerd. Hiervoor worden eerst het alpha-synucleïne-model en het 6OH-DA-model uitgetest en vervolgens het uit deze testen naar voren komende, meest geschikte PD-model gebruikt. Men wil daarna in dit model stamcellen toedienen en tevens effecten van een combinatie van neuronale groeifactoren met stamceltherapie samen bekijken. Met name die combinatie van stamcellen met neuronale groeifactoren kan nieuwe resultaten geven.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën, te weten fundamenteel onderzoek en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het therapeutische effect van de combinatie van twee verschillende soorten behandelingen op het ontregelde dopaminecircuit in een muismodel voor de ziekte van Parkinson te onderzoeken. Het uiteindelijke doel van het project is een bijdrage te leveren aan een verbeterde stamceltherapie voor patiënten met de ziekte van Parkinson waarbij het dopaminerge systeem daadwerkelijk herstelt, en niet alleen de symptomen worden verlicht. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het translationele neurowetenschappelijke onderzoeksveld en de behoeften vanuit de neurologische gezondheidszorg en specifiek t.a.v. de ziekte van Parkinson.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers, financierende organisatie en patiënten met de ziekte van Parkinson en hun naasten. De proefdieren hebben er een groot belang bij gevrijwaard te blijven van de dierproeven, het ongerief en de vroegtijdige dood. De samenwerkende onderzoekers en andere onderzoekers in dit vakgebied hebben, evenals de financierende organisatie, een groot belang bij (positieve) onderzoeksresultaten om mogelijk te kunnen bijdragen aan een therapie voor deze veelvoorkomende ernstige ziekte. Ook (toekomstige) patiënten met de ziekte van Parkinson en hun naasten hebben, evenals de neurologische gezondheidszorg, een groot belang bij dit onderzoek, aangezien een verbeterde combinatietherapie niet alleen de (motorische) symptomen zou kunnen verkleinen, maar ook de activiteit van het dopaminerge systeem zou kunnen herstellen, waardoor de kwaliteit van leven wordt verhoogd.
6. De aanvrager geeft aan geen nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van o.a. de gebruikte technieken door de ervaren onderzoeksgroep met de stamcelexpert en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De onderzoeker heeft daarbij voldoende onderbouwd hoe de resultaten bijdragen aan een verbeterde uitgangssituatie voor stamceltherapie in de humane situatie.

De DEC heeft gediscussieerd over de te testen PD-modellen. Men wil namelijk eerst zowel het alpha-synucleïne-model als het 6OH-DA-model uittesten, om daarna het meest geschikte PD-model te gebruiken. Het bezwaar van de commissie was dat waarschijnlijk het 6OH-DA-model veel rigoureuzer is en dus uiteindelijk veel geschikter is, en dat dit het model wordt waarmee men het project uitvoert. Het project is gericht op het beginstadium van Parkinson; de ziekte is echter progressief. Maar in het 6-OH-DA-model in de muis wordt zodanige schade aan het dopaminerge systeem aangebracht dat de toestand al direct vergelijkbaar wordt met een gevorderd stadium van de ziekte van Parkinson. De literatuur over het alpha-synucleïne-model is (nog) niet eenduidig, maar als dit model aan de criteria voldoet heeft het de voorkeur van de onderzoekers. Het veel gebruikte 6OH-DA-model is voor hen een back-up-strategie. Vandaar dat zij beide modellen eerst willen vergelijken. De DEC vindt de onderbouwing hiervan voldoende.

De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Tijdens de training en gedragstesten worden de muizen frequent, maar relatief kort, individueel in een thuis-kooi geplaatst, als onderdeel van de cognitieve gedragstest. Tussendoor en na het experiment worden de muizen weer bij elkaar geplaatst. Aangezien dit onderdeel is van de test, wordt dit volgens de DEC terecht niet aangemerkt als individuele huisvesting.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is met 'ernstig' realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het cumulatieve ongerief ontstaat met name door de inductie van Parkinson en de daaruit volgende klachten. De operaties vinden plaats onder algehele narcose. Voor, tijdens en na de chirurgische ingreep worden analgetica toegediend. Na de operatie ontwikkelt de muis symptomen vergelijkbaar met de humane symptomen van de ziekte van Parkinson, waarbij niet

alleen het motorisch functioneren wordt verstoord, maar ook cognitieve functies worden aangetast. Hierdoor wordt de integriteit van het dier aangetast.

Met name in de eerste fase na inductie van Parkinson, waarin ernstige verlammingen kunnen optreden, worden de dieren frequent gemonitord. De onderzoekers maken bij deze monitoring van het welzijn en de gezondheid van de dieren volgens de DEC gebruik van een goed doordachte en waardevolle HEP-scorelijst. De commissie heeft bediscussieerd of de lijst volstaat om *zeer* ernstig ongerief te voorkomen. De commissie is van mening dat de ernst van het cumulatieve ongerief met name wordt veroorzaakt door de inductie van Parkinson, en dat de overige experimentele handelingen, waaronder een mogelijke vervolgooperatie voor injectie van tracers en/of sensoren, er niet toe zullen leiden dat cumulatief ongerief in de categorie zeer ernstig op zou treden. Daarnaast verwacht de commissie dat de voorgestelde maatregelen zeer ernstig ongerief als gevolg van de inductie van Parkinson zullen voorkomen.

De commissie vroeg zich tevens af hoe belastend de intranasale toediening van stamcellen zou zijn voor de dieren. De onderzoeker heeft toegelicht dat de methode, waarbij een klein druppeltje vloeistof spontaan door de muis (nasaal) geïnhaleerd wordt, niet invasief en vrijwel niet belastend is.

12. De integriteit van de dieren wordt met name fysiek aangetast door het operatief induceren van de ziekte van Parkinson, waardoor motorische en cognitieve stoornissen worden veroorzaakt, de eventuele vervolgooperatie voor de injectie met tracers of sensoren, de verschillende gedragstesten en tevens door de vroegtijdige dood.
13. De humane eindpunten, zoals pijn (anders dan door PD-inductie) en gewichtsverlies, zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en worden door middel van een HEP-scorelijst vastgesteld en frequent gemonitord. Bij PD-inductie-gerelateerde pijn wordt o.a. pijnstilling toegediend. Het percentage dieren (10-15%) dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De commissie waardeert de scorelijst, waarmee het welzijn en het ongerief van de dieren frequent wordt gemonitord en meer ongerief wordt voorkomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, zoals hersenorganoïden of humane postmortem studies voor het *in vivo* meten van cognitief en motorisch herstel.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De DEC heeft gediscussieerd over de bestudering van de effecten op beide seksen afzonderlijk, waardoor zowel mannelijke als

vrouwelijke dieren nodig zijn (zie tevens C18). De DEC onderschrijft de keuze van de onderzoeker.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd, door zelftraining, een warmtemat, zacht voer en kooiverrijking.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten worden ingezet en onderzocht omdat zowel de aard en de ernst van de symptomen van de ziekte van Parkinson als de effectiviteit van behandelmethoden kunnen verschillen tussen mannen en vrouwen. De DEC ziet het belang hiervan in.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood in verband met het benodigde hersenweefsel voor nadere analyse van de effectiviteit van de behandeling. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De DEC heeft vragen gesteld over een aantal hiaten, waarop de aanvrager verbeteringen heeft aangebracht. De aantallen dieren zoals vermeld bij de mate van ongerief in de bijlage komen echter niet overeen met de aantallen dieren zoals vermeld in de NTS.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk de meerwaarde bepalen van een vernieuwende combinatie van stamceltherapie met neuronale groeifactoren voor de ziekte van Parkinson, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van 1.344 proefdieren plaats, met matig (384 dieren) en ernstig (960 dieren) ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan kan dit project ertoe bijdragen dat de behandelmethodes voor patiënten met de ziekte van Parkinson aanzienlijk worden verbeterd. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van

proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het testen van de combinatie van toediening van stamcellen met toediening van neuronale groeifactoren in het daarvoor meest geschikte Parkinsonmodel in de muis, een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Dit onderzoek is niet gericht op de primaire oorzaak of preventie maar op therapie en betreft een afgebakend project over stamcellen in een Parkinsonmodel, met voor veel dieren ernstig ongerief. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is daarbij voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd. Aangezien een groot deel van de dieren, ondanks de toepassing van humane eindpunten, ernstig ongerief zullen ervaren, zal een reflectie op het project en het ongerief door middel van een Beoordeling Achteraf noodzakelijk zijn.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202418519

Bijlagen

2

Datum 29 november 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 28 november 2024. Het gaat om uw project "Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202418519. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

29 november 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202418519

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500

Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]

Postbus: 12007

Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag

Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2025
Geplande einddatum: 31 december 2029
Titel project: Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours
Titel niet-technische samenvatting: Effecten van stamceltherapie op breinherstel voor de bewegingsproblemen en de cognitieve symptomen bij de ziekte van Parkinson
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.617,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 28 november 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD11500202418519
Bijlagen
2

Datum 29 november 2024
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 29 november 2024
Vervaldatum: 29 december 2024
Factuurnummer: 2418519
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202418519	€ 1.617,00

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

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Cc: dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD11500202418519
Date: vrijdag 14 februari 2025 14:21:35

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 28-11-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours" met aanvraagnummer AVD11500202418519. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- In uw NTS onder de kop 'Doelstellingen' gebruikt u de term 'Farmacologisch' en onder de kop 'potentiele voordelen' gebruikt u de term 'PD'. Deze termen zullen voor het algemene publiek lastig navolgbaar zijn. Kunt u deze termen aanpassen of uitleggen?

- In uw NTS onder de kop 'Verwachte gevolgen' gebruikt u de term 'ongemak'. Kunt u deze term aanpassen naar de wettelijke benaming "ongerief"?

- U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Onduidelijkheden

- Mochten uw antwoorden voor vrijdag 21 februari a.s. door ons ontvangen zijn, kunnen deze worden meegenomen tijdens de inhoudelijke bespreking van uw dossier in de vergadering van de CCD.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen


Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven


www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Datum: 27 Februari 2025 **Plaats:** Utrecht
Betreft: Beantwoording vragen CCD over aanvraag AVD11500202418519

UMC Brain Center
[Redacted]

Geachte lezer,

Op vrijdag 14 februari 2025 ontvingen wij een bericht van uw commissie met betrekking tot onze aanvraag voor een projectvergunning genaamd "*Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours*", met aanvraagnummer AVD11500202418519. In uw brief noemde u drie punten waarop u aanvullende informatie nodig had. We hadden op 20 februari een reactie op deze punten opgesteld, maar we hebben na recent overleg met de IvD begrepen dat onze brief u destijds helaas niet bereikt heeft. Daarom sturen we bij deze een nieuwe brief, met antwoorden op de destijds gestelde vragen, en tevens op de nieuw opgekomen vraag tijdens uw commissievergadering van 21 februari 2025. Hieronder vindt u de door u genoemde punten, met onze respons hierop ([in blauw](#)).

Punt 1: In uw NTS onder de kop 'Doelstellingen' gebruikt u de term 'Farmacologisch' en onder de kop 'potentiele voordelen' gebruikt u de term 'PD'. Deze termen zullen voor het algemene publiek lastig navolgbaar zijn. Kunt u deze termen aanpassen of uitleggen?

[Dank u voor deze suggesties, wij hebben dit aangepast in de nieuwe versie.](#)

Punt 2: In uw NTS onder de kop 'Verwachte gevolgen' gebruikt u de term 'ongemak'. Kunt u deze term aanpassen naar de wettelijke benaming "ongerief"?

[Wij hebben dit nu gecorrigeerd.](#)

[We hebben tevens de door de DEC opgemerkte benodigde correctie uitgevoerd in de NTS m.b.t. dieraantallen in de ongerief distributie.](#)

Punt 3: U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

[We hebben dit nu gedaan.](#)

Punt 4: Zijn er modellen overwogen waarbij hersenoperaties ter inductie van het PD model niet nodig zijn?

[Dank u voor deze relevante vraag. Wij hebben dit zeker overwogen, want het zou in principe onze voorkeur gehad hebben om een model te hebben waarbij er geen hersenoperaties nodig zouden zijn. Wij hebben twee dergelijke modellen overwogen, maar we hebben helaas moeten vaststellen dat deze](#)

Visiting address:

[Redacted]
Universiteitsweg 100
3584 CG Utrecht
The Netherlands

Postal address:

[Redacted]
P.O. Box 85060
3508 AB Utrecht
The Netherlands

niet robuust genoeg zijn om het experiment in uit te voeren. Om precies te zijn hebben we gekeken naar:

- (1) In plaats van hersenoperaties is het in theorie mogelijk om een virus (AAV) systemisch in de bloedbaan te brengen dat vervolgens (ook) in de hersenen leidt tot overexpressie van een Parkinson-gerelateerd schadelijk eiwit, zoals de ook hier genoemde gemuteerde varianten van alfasynucleïne. Hier refereren we aan in onze aanvraag (Bijlage – “Refinement”):

“We are also in collaboration with researchers in Amsterdam who are setting-up in parallel to us a similar mutated alpha-synuclein overexpression mouse model, however, they are using a different administration route, namely through orbital injection. In case their approach is successful as defined by our GO/NO-GO criteria we will use their method instead as it would reduce discomfort to the animals.”

Deze studies van collega’s ██████████ lopen nog, maar vooralsnog lijkt het erop dat met deze methode de motorische effecten relatief mild en variabel zijn, en pas laat in het muizenleven optreden, en het is daarnaast ook nog onduidelijk of er ook cognitieve symptomen zijn en in welke mate. Er is kortom op dit moment helaas nog niet de duidelijkheid of deze methode afdoende werkbaar is voor onze studievraag (het is lastig om te zien of stamcelbehandeling werkt, als het model mild en variabel is voor motorsymptomen, en mogelijk niet de cognitieve symptomen vertoont).

- (2) Het tweede soort model dat we hebben overwogen is een genetisch gemodificeerde muis. Een van de meest theoretisch interessante is wat dat betreft een muis met overexpressie van gemuteerde alphasynucleïne in bepaalde hersencellen waaronder de dopaminerge. Een bekende muis (<https://www.jax.org/strain/008239>) wat dat betreft is dan ook al door collega’s van ons in Utrecht ██████████ eerder geïmporteerd en bestudeerd. De (voorlopige) conclusie van dat werk is dat deze muizen geen duidelijk motor defect hadden, of mogelijk een heel mild en variabel fenotype.

Concluderend, binnen het veld wordt soms gebruik gemaakt van genetische modellen en ook wordt er in toenemende mate gekeken naar systemisch toegediende virussen. Vooralsnog zijn de bijbehorende motor symptomen van deze modellen mild, variabel, en treden ze überhaupt ook pas heel laat op. Daarnaast zijn de cognitieve non-motor symptomen vaak nog milder of niet goed in kaart gebracht. De methodes met hersenoperaties zijn invasiever en tijdrovender, maar het is bekend in het veld dat ze wel veel robuuster zijn in de motorische en cognitieve effecten die ze teweegbrengen. Daarom zijn het in de praktijk o.i. geschiktere modellen voor onze huidige onderzoeksvragen. Wel houden wij uiteraard ontwikkelingen op dat vlak in de gaten voor mogelijke verfijningen in (toekomstig) onderzoek.

Wij hopen hiermee aan uw verzoek gehoor te hebben gegeven.

Hoogachtend,





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202418519

Bijlagen

3

Datum 19 maart 2025

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 28 november 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours" met aanvraagnummer AVD11500202418519. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 19 maart 2025 tot en met 18 maart 2030.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2031 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

19 maart 2025

Aanvraagnummer:
AVD11500202418519

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 13 februari 2025. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 14 februari 2025 en 24 februari 2025 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op aanpassingen in de niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2031 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

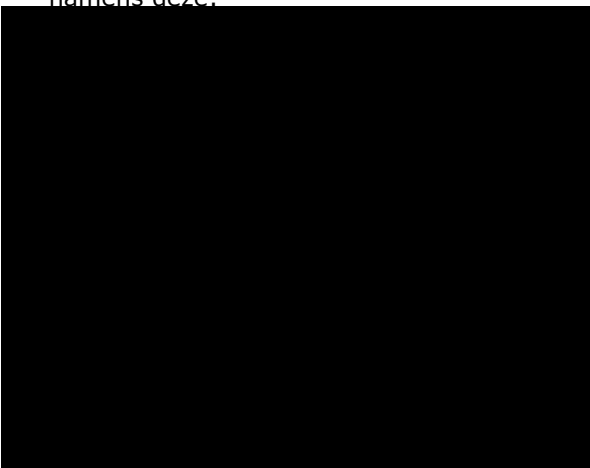
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Datum:
19 maart 2025
Aanvraagnummer:
AVD11500202418519

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 maart 2025 tot en met 18 maart 2030, voor het project "Effects of stem cell treatment on detailed dopamine circuit dynamics during Parkinson's disease motor and non-motor behaviours" met aanvraagnummer AVD11500202418519, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

[REDACTED] Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 november 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 13 februari 2025;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Molecular, cellular and functional analysis of the effects of stem cell treatment on dopamine circuit dynamics in PD , zoals ontvangen op 13 februari 2025;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 28 februari 2025;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 13 februari 2025
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 28 februari 2025.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Molecular, cellular and functional analysis of the effects of stem cell treatment on dopamine circuit dynamics in PD			
	Muizen (Mus musculus) / C57B6J, Transgenic mice (Cre/FLP lines) on C57B6J background.	1.344	71,4% Ernstig 28,6% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2031 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer: AVD11500202418519

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD11500202418519

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD11500202418519

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.