

Inventaris Wob-verzoek W16-04s									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 20151212								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Brief CCD vragen				x		x		
4	reactie vragen CCD				x		x	x	
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
6	Beschikking en vergunning				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Bijlage dierproef 1				x		x	x	
9	Bijlage dierproef 2				x		x	x	
10	Bijlage dierproef 3				x		x	x	
11	Bijlage dierproef 4			x					
12	Projectvoorstel				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: [Redacted]
 KvK-nummer: 3 0 2 7 5 9 2 4

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer: Instantie voor Dierenwelzijn
 Postbus: 12007
 Postcode en plaats: 3501AA Utrecht
 IBAN: NL27INGB0000425267
 Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters: [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie: [Redacted]
 Afdeling: [Redacted]
 Telefoonnummer: [Redacted]
 E-mailadres: [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters: [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie: [Redacted]
 Afdeling: [Redacted]
 Telefoonnummer: [Redacted]
 E-mailadres: [Redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [Redacted] | |
| Afdeling | [Redacted] | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | |
| E-mailadres | [Redacted] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 1 0 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 . 1 0 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergiën
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Optimalisatie van therapie voor voedselallergiën met voedingssupplementen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Typen dierexperiment 3.4.4.1 t/m 3.4.4.4

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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 F 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

Datum

Handtekening

W. Hecht
12-8-2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
t.a.v. [REDACTED]
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015212

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 24 september 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 12 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' met aanvraagnummer AVD108002015212. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief 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:

Onduidelijkheden

Het is de CCD niet helder op basis van welke criteria wordt besloten welke allergeen-specifieke therapie en immuunmodulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden.

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

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 deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

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.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum
24 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015212

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015212

Bijlagen

2

Datum 14-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015212. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2020
Titel project: Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën
Titel niet-technische samenvatting: Optimalisatie van therapie voor voedselallergieën met voedingssupplementen
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

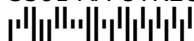
12 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015212

Bijlagen

2

Datum 14-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 augustus 2015

Vervaldatum: 13 september 2015

Factuurnummer: 201570212

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015212	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]
t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD108002015212

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 29 oktober 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 12 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' met aanvraagnummer AVD108002015212. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 08 oktober 2015 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' starten. De vergunning wordt afgegeven van 29 oktober 2015 tot en met 01 oktober 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd d.d. 10 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Op onderstaande punten wijken wij af van het DEC advies.

1) U heeft in uw aanvraag aangegeven alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken voor dit project. Uw overwegingen voor het alleen gebruik van vrouwelijke dieren heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. Uit uw aanvraag volgt dat voedselallergie zowel bij mannen als vrouwen voorkomt. Uw argument dat voedselallergie meer bij vrouwen dan bij mannen voorkomt, is volgens de CCD geen reden om het onderzoek met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Daarnaast heeft u uw argument dat er minder variatie zal zijn bij het gebruik van alleen vrouwelijke dieren niet met wetenschappelijk bewijs onderbouwd. U heeft ook niet aangetoond dat u bij het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uw doelstellingen niet kunt behalen. De CCD is om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken voor dit project. In dit project dient daarom een pilotstudie te worden uitgevoerd waarin vastgesteld wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en

vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

2) U heeft op 08 oktober 2015 aanvullende informatie verstrekt over de criteria op basis waarvan besloten wordt welke toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden. In uw brief geeft u aan dat u in eerste instantie subcutane en orale immunotherapie gaat vergelijken en dat het uitgangspunt van het project een dieetinterventie met prebiotica zal zijn. De vervolgstappen zijn volgens u afhankelijk van de resultaten uit de eerste dierproeven. De CCD is van mening dat u de criteria op basis waarvan u, na de eerste proeven met bovengenoemde voedingssupplementen en toedieningswijzen, gaat beslissen met welke toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen u uw onderzoek zult voortzetten niet voldoende beschreven zijn. Bovendien heeft u de criteria op basis waarvan gekozen wordt welke specifieke allergenen geselecteerd gaan worden niet beschreven. U dient daarom de criteria op basis waarvan besloten wordt welke allergeen-specifieke therapie, toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden voor aanvang van het project af te stemmen met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

3) U heeft in uw aanvraag schematisch aangegeven wat de onderlinge verhoudingen zijn tussen de verschillende type dierproeven. De CCD is echter van mening dat de criteria op basis waarvan besloten wordt of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden niet voldoende zijn beschreven. U dient daarom, in het kader van vermindering, de go/no go momenten voor aanvang van het project vast te stellen en de criteria daarvoor ter goedkeuring voor te leggen aan de IvD.

4) In uw aanvraag geeft u aan gebruik te gaan maken van genetisch gemodificeerde dieren waarin specifieke genen uitgeschakeld zijn. Zodra bekend is wat de aard van de mutatie zal zijn, dient uw het ongerief van deze dieren in te schatten en de humane eindpunten voor deze dieren vast te stellen en dit af te stemmen met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om het ongerief van dieren zoveel mogelijk te beperken.

5) U heeft in uw aanvraag humane eindpunten gedefinieerd voor dieren die een anafylactische shock ervaren. Indien een dier veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid vertoont die meer dan 90 minuten aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en gaat u het desbetreffende dier doden. De CCD vraagt zich af of inderdaad pas na 90 minuten bepaald kan worden of herstel van de anafylactische shock niet waarschijnlijk is. Om te voorkomen dat dieren onnodig lang ongerief hebben, dient u voor aanvang van het project goed naar deze criteria te kijken en deze af te stemmen met de IvD. Hierbij dient met name aandacht besteed te worden aan de duur van de observatieperiode die nodig is om te bepalen of herstel van de anafylactische shock wel/niet waarschijnlijk is.

Wij nemen de rest van het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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 gegevens in het colofon.

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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Postbus: 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 oktober 2015 tot en met 01 oktober 2020, voor het project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' met aanvraagnummer AVD108002015212, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat de CCD niet overtuigd is van de onmogelijkheid om zowel mannelijke als vrouwelijke dieren te gebruiken voor dit project. Daarnaast is de CCD van mening dat de criteria voor de go/ no go momenten en de keuze voor de immuun modulerende voedingssupplementen, de toedieningswijze van de immunotherapie en de allergenen niet voldoende zijn uitgewerkt.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 augustus 2015 en de aangepaste Niet-technische Samenvatting, zoals ontvangen bij digitale indiening op 28 oktober 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen per digitale indiening op 12 augustus 2015
 - d. Aanvullende informatie, zoals ontvangen bij digitale indiening op 08 oktober 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Muismodel voor voedselallergie	Muis	3200	Licht: 10% (sham sensibilisatie) Matig: 90%
Transfer studie	Muis	1600	Matig
Depletie studie	Muis	800	Licht: 10% (sham sensibilisatie) Matig: 90%
Donor studie	Muis	260	Licht

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

- 1) In een pilotstudie wordt vastgesteld of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Deze pilotstudie kan parallel/ geïntegreerd aan de eerste studie met vrouwelijke dieren worden uitgevoerd. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren in voorraad moeten worden gedood.

Datum

29 oktober 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002015212

De aanvrager moet de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

- 2) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de criteria op basis waarvan besloten wordt welke allergeen-specifieke therapie, toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden voor aanvang van het project af te stemmen met de IvD.
- 3) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten voor aanvang van het project worden vastgesteld en dat de IvD instemt met de vastgestelde criteria.
- 4) De criteria voor het bereiken van de humane eindpunten dienen voor aanvang van het project met de IvD worden geoptimaliseerd. Hierbij dient met name aandacht besteed te worden aan de duur van de observatieperiode die nodig is om te bepalen of herstel van de anafylactische shock wel/niet waarschijnlijk is.
- 5) Het ongerief van eventueel te gebruiken knock-out muizen en de humane eindpunten voor deze dieren dienen voor aanvang van desbetreffende dierproeven te worden afgestemd met de IvD.
- 6) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 blijven schade

Datum
29 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015212

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b 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 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 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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.814.012
2. Titel van het project : Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergiën
3. Titel van de NTS : Optimalisatie van therapie voor voedselallergieën met voedingssupplementen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 12-06-2015
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 17-06-2015
- anderszins behandeld: per email 15-07-2015
- termijnonderbreking(en) van / tot : 26-06-2015 tot 14-07-2015
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 10-08-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 26-06-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Gezien het feit dat er al meerdere projecten bij de DEC gepasseerd zijn waar ook immunotherapie en voedselinterventie hebben plaatsgehad, klopt de zin "*De combinatie van allergeen-specifieke immunotherapie en een dieetinterventie is nog niet eerder getest in een diermodel*" niet. De DEC verzoekt u deze zin te verwijderen. Daarnaast mist de DEC hier juist de brug naar vorige projecten. Wat heeft voorgaand onderzoek opgeleverd, wat is er nog niet bekend (de witte vlek) en wat verwacht u met die onderzoek te bereiken (wat is de focus)? Graag nader toelichten.
- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of het muismodel de juiste keuze voor dit project? Muizen zijn van zichzelf niet allergisch, maar worden allergisch gemaakt. Bij mensen komt allergie constitutioneel voor. Graag nader onderbouwen waarom dit dan toch het beste diermodel zou zijn.
- 3.2 Doel: De DEC raadt u aan het woord 'veilig' te vervangen door 'efficiënter en met minder bijwerkingen'. Nu wordt de indruk gewekt dat een safety studie wordt gedaan, maar bedoeld wordt 'minder bijwerkingen'.
- 3.3 Belang: Ook hier graag het woord 'veilig' vervangen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Ook hier graag het woord 'veilig' vervangen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U geeft aan dat parallel aan dit project humaan in vitro onderzoek plaatsvindt. Betekent dit ook dat u gedurende het experiment kijkt naar de werkzaamheid van de resultaten in de mens? Zo ja, op welke momenten zou dit plaatsvinden? En wordt het onderzoek aan de hand daarvan eventueel ook bijgesteld? Dit zou de studie ook deels translationeel maken. De DEC verzoekt u dit duidelijker weer te geven in het projectvoorstel. Tevens graag de relatie met de kliniek (consortium noemen) weergeven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie, schema: Ook hier graag het woord 'veilig' vervangen.

Bijlage 1, 2 en 3:

- B. De dieren: De DEC begrijpt dat de prevalentie hoger is in vrouwen dan in mannen, maar wat is de prevalentie van allergie bij jongetjes en bij volwassen mannen en wordt dat dan later ook vertaald in het herhalen van de positieve bevindingen in mannelijke muizen? Graag toelichten. Daarnaast adviseert de DEC u het gebruik van alleen vrouwelijke muizen nader te motiveren.
- J. Humane eindpunten: De DEC adviseert u om hier aan te geven dat gedurende de periode dat er een shock kan optreden onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag in de gaten te houden.

- Datum antwoord: 14-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De achtergrondinformatie is uitgebreid en er is nu duidelijk toegelicht waarom het gekozen diermodel het beste model is.
- 3.2 Doel: Dit is aangepast als volgt: *"Het hoofddoel van dit project is het verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen. Tevens willen wij het werkingsmechanisme van de genoemde combinatie onderzoeken."*
- Op diverse plaatsen in het projectvoorstel is het woord 'veilig' vervangen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De aanvraag is aangepast als volgt: *"Om het werkingsmechanisme in de mens tevens uit te diepen zal parallel aan dit onderzoek in diermodellen, aanvullend humaan in vitro onderzoek worden uitgevoerd in een apart AiO project. De in vitro modellen zijn gebaseerd op combinaties van humane darmepitheelcellijnen en bloedcellen uit gezonde personen en allergische patiënten. Immuncellen verkregen van allergische patiënten zullen al dan niet in combinatie met darmepitheelcellen worden blootgesteld aan de voedingssupplementen, zodat er gekeken kan worden of deze supplementen effect hebben op de cellulaire response en wat het immunologische mechanisme is. De verkregen resultaten worden binnen het consortium besproken en kunnen bijdragen aan de verfijning en bijstellen van het onderzoek in diermodellen en in de toekomst ook aan de translatie van de strategie naar een klinische studie. De betrokkenheid van onderzoekers/artsen van het academisch ziekenhuis (UMC) met ervaring in voedselallergie biedt het consortium de mogelijkheid om de experimentele bevindingen uit het in vitro en dieronderzoek in de toekomst naar studies in de mens te vertalen."*

Bijlage 1, 2 en 3

- B. De dieren: De aanvraag is als volgt aangepast: *"Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (██████████). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in preklinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter (██████████). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekent dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van hetzelfde geslacht zijn. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag."*

Volgens Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeO_uJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeO_uJ voor kankeronderzoek. Het

gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Dit is opgenomen in de projectaanvraag.

- J. Humane eindpunten: Hier is toegevoegd: "*Gedurende de periode dat er een anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden.*"

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen. Daarnaast kan het bijdragen aan het ophelderen van het werkingsmechanisme van immunotherapie met voedingssupplementen. Voedselallergieën, veroorzaakt door eiwitten, zijn een belangrijk maatschappelijk probleem dat veel leed veroorzaakt voor mensen met deze vorm van allergie. Het toepassen van immunotherapie is een veelbelovende methode tegen deze vorm van voedselallergie, maar geeft momenteel nog te veel allergische bijwerkingen en is daarom nog niet geschikt voor

toepassing op de mens. Het door middel van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek verbeteren van de effectiviteit van allergeen-specifieke immunotherapie en het verminderen van de bijwerkingen daarvan, alsmede het verwerven van inzicht in het werkingsmechanisme van immunotherapie en voedingssupplementen is daarom van groot belang. Deze fundamenteel wetenschappelijke studie, bestaande uit preklinische dier- en in vitro experimenten, zal niet direct leiden tot een effectievere behandeling van voedselallergieën, maar kan in de toekomst mogelijk bijdragen aan vervolgonderzoek en het testen van de genoemde strategie in een klinische studie.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. 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)
 - Gefokt voor dierproeven (11)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Huisvesting en verzorging
 - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief in de eerste en derde bijlage is voor ongeveer 10% van de dieren als licht ingeschat vanwege de sham sensibilisatie. Deze dieren zullen geen allergische reactie krijgen. 90% Van de dieren zal matig ongerief ondervinden vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en vanwege de kort durende anafylactische reactie. Voor bijlage 3 geldt tevens dat het ongerief van de knock-out/depletie dieren pas wordt ingeschat wanneer bekend is welke receptoren of eiwitten geblokkeerd worden in het dier. Dit wordt voor aanvang van het experiment afgestemd met de IvD. In de tweede bijlage is het ongerief ingeschat als matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en voor de ontvangstdieren tevens vanwege de korte anafylactische reactie. Het ongerief in bijlage 4 is ingeschat als licht omdat de donordieren weinig tot geen behandelingen zullen ondergaan. Gezien de handelingen is de DEC van mening dat de ongeriefsinschattingen realistisch zijn.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Bij de ontwikkeling van voedselallergieën spelen vele verschillende aspecten een rol,

zoals de immuuncellen in de darmen, de slijmvliezen in de mond, de huid en de cellen die in de bloedbaan voorkomen of in de klieren verblijven, waardoor het geheel een complex proces is. Vanwege de complexiteit is het niet mogelijk om het volledige project in vitro na te bootsen en zijn proefdieren noodzakelijk. Voorafgaand aan het project zal met behulp van cellijnen en primaire celkweken in vitro onderzoek worden gedaan naar de precieze werking van de voedingssupplementen (bijlage 1) en welke factor een rol speelt en dus interessant is om met behulp van een depletiestudie te onderzoeken (bijlage 3). Het onderzoek in bijlage 4, het in vitro testen van allergenen/allergeenstructuren en voedingscomponenten aan de hand van donormateriaal, kan ervoor zorgen dat een in vivo experiment (met meer ongerief voor het dier) niet nodig zal zijn.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd. Voor bijlage 1, 2 en 3 geldt dat voor het berekenen van het aantal benodigde dieren statistische methoden worden toegepast. De berekeningen zijn gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. In bijlage 4 wordt het aantal dieren bepaald door de benodigde hoeveelheid donormateriaal om alle gewenste experimentele- en controle condities te testen.

In de eerste drie bijlagen wordt gebruik gemaakt van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat:

- Voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in preklinisch onderzoek om die reden mogelijk relevanter.
- Er minder variatie binnen een experiment is wanneer maar één geslacht gebruikt wordt, waardoor minder dieren nodig zijn.
- Vrouwelijke muizen minder de neiging hebben om te vechten, waardoor ze eenvoudiger gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.
- Er volgens leverancier Charles River een fokoverschot is van vrouwelijke C3H/HeO_uJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeO_uJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen.

Het geslacht van de donormuizen in bijlage 4 zal voor specifieke T cel reacties donormateriaal van vrouwelijke muizen verzameld worden, zodat het sensibiliseren vergelijkbaar verloopt en er een vergelijking gemaakt kan worden met de resultaten uit in vivo experimenten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In dit project wordt gebruik gemaakt van muizen die gevoelig zijn voor voedselallergieën, waardoor deze muis een geschikte donor is voor o.a. allergeen-specifieke cellen die gebruikt

kunnen worden in een in vitro experiment en het effect van de therapie goed onderzocht kan worden. Vanwege jarenlange ervaring binnen de onderzoeksgroep is het te gebruiken model een verfijnd model met zo beperkt mogelijk ongerief.

Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden. Het is mogelijk dat de dieren na het challengen een anafylactische shock krijgen waarvan herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. In dat geval zullen dieren eerder gedood worden om het ongerief te beperken. De dieren zullen gezamenlijk gehuisvest worden.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen bestuderen, substantieel is en opweegt tegen het ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

De DEC is van mening dat gekozen is voor de juiste onderzoeksstrategie en dat de genoemde handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. De onderzoekers hebben goed beargumenteerd waarom zij in dit onderzoek voornamelijk vrouwelijke muizen willen gebruiken. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Waar mogelijk worden eerst in vitro experimenten uitgevoerd. Bij ca. 80% van de dieren treedt, als gevolg van het frequent toedienen van stoffen met matig klinische verschijnselen en/of een anafylactische shock matig ongerief op. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het lichte tot matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------------|
| 3.4.4.1 | Muismodel voor voedselallergie |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Om de doelstelling van deze projectaanvraag te bereiken zullen wij hoofdzakelijk gebruik maken van het al ontwikkelde muismodel voor voedselallergie (Smit, 2012)(van Esch, 2013). In dit muismodel voor voedselallergie zullen wij kijken naar verschillende allergenen zoals pinda en het koemelk eiwit wei. Met behulp van het voedselallergie model in de muis kunnen wij onderzoeken welk type behandeling het meest geschikt is om de acute allergische response te verminderen en/of lange termijn bescherming tegen de allergie te bevorderen. Om de effectiviteit en de veiligheid te bepalen zullen wij voornamelijk gebruik maken van klinische parameters om de mate van de allergische response na een challenge vast te stellen. Voorbeelden hiervan zijn de acute zwelling in de huid van het oor na injectie van het allergeen, het meten van lichaamstemperatuur daling na challenge (anafylaxie) en het geven van een score gebaseerd op

uiterlijke symptomen van anafylaxie. Om ook te kijken wat er mechanistisch gebeurt, zullen wij naast klinische parameters ook kijken naar cellulaire en humorale parameters die we meten in bloed en organen. Voorbeelden hiervan zijn stoffen zoals histamine (Finkelman, 2007) die vrijkomen na mast cel degranulatie in het serum, antigeen-specifieke antilichamen in het serum en cellen geïsoleerd uit lymf organen en beenmerg. Het voedselallergie model bestaat uit drie verschillende fasen: in de eerste fase worden de naïeve dieren gesensibiliseerd met een oplossing van het allergeen in PBS met daaraan toegevoegd een adjuvant (bijv. cholera toxine). Door herhaaldelijke toediening van deze oplossing ontwikkelen de dieren een allergie tegen het specifieke allergeen. In de tweede fase van het experiment worden de dieren herhaaldelijk behandeld met het allergeen (immunotherapie) om de reactie van het immuunsysteem te veranderen. Deze immunotherapie kan worden gecombineerd met een dieetinterventie met als doel het proces van tolerantie inductie te ondersteunen. In de derde fase van het experiment worden de behandelde dieren blootgesteld aan een (hoge) test dosering van het allergeen om de effectiviteit van de therapie vast te stellen. In niet-behandelde dieren treedt na blootstelling anafylaxie op en deze reactie is naar verwachting in mindere mate aanwezig in dieren die immunotherapie hebben ondergaan.

Smit J.J. et al. Contribution of Classic and Alternative Effector Pathways in Peanut-Induced Anaphylactic Responses, Plos One, 2012.

van Esch B.C.A.M et al. Interlaboratory evaluation of a cow's milk allergy mouse model to assess the allergenicity of hydrolysed cow's milk based infant formulas, Toxicology Letters, 2013.

Finkelman F.D. et al. Anaphylaxis: lessons from mouse models, J Allergy Clin Immunol, 2007.

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.

Vanaf de start van het experiment, de sensibilisatie fase, zullen de dieren minimaal 5 en maximaal 8 keer per orale gavage een oplossing van allergeen plus een adjuvant (bijv. cholera toxine) binnen krijgen (één of meerdere gavages per week). Een alternatieve sensitizatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant. Vervolgens krijgen de dieren tijdens de therapie fase gedurende 2-4 weken herhaaldelijk een behandeling met het allergeen in PBS (minimaal 1x per week, maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute). Na de therapie fase volgt een korte periode van rust waarna de dieren worden blootgesteld aan de challenge die via verschillende toedieningsroutes gegeven kan worden. Indien gewenst kan na de challenge lichaamstemperatuur worden gemeten met een rectale thermometer op minimaal 1 en maximaal 8 tijdstippen. De challenge in het oor wordt uitgevoerd onder anesthesie. De dieren zijn maximaal 1 minuut onder anesthesie per meetmoment (maximaal 2 meetmomenten). Indien gewenst kan op bepaalde tijdstippen tijdens het experiment bloed worden afgenomen en kunnen feces monsters worden verzameld. De dieren worden tijdens de feces verzameling voor korte periode apart gehuisvest. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Een negatieve controle groep wordt sham gesensibiliseerd en sham behandeld, een positieve controle groep wordt met allergeen gesensibiliseerd en sham behandeld. Afhankelijk van de onderzoeksvraag, kan er ook gekozen worden voor een tolerante controlegroep. Deze groep krijgt het allergeen zonder adjuvant toegediend. Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de kwaliteit van het allergiemodel te waarborgen. Daarnaast wordt er voor iedere behandelgroep op een experimenteel dieet een vergelijkbare groep meegenomen op controledieet. Het gekozen aantal groepen is wat minimaal nodig is om de juiste vergelijkingen te kunnen maken en om betrouwbare resultaten te krijgen. De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van een relevante parameter. Per experiment kan bepaald worden welke parameter het meest relevant is. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de acute allergische response in het oor (oorzwellings), of antilichaam waardes in het serum. Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte dus op de aantallen die uit de

powerberekening komen. Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling (PE=pinda eiwit; SCIT=subcutane immunotherapie; OIT=orale immunotherapie; ■■■ dieet= fructo-oligosacchariden verrijkt dieet):

A n=6	PBS sensibilisatie	sham therapie+controle dieet	PE challenge
B n=8	PE sensibilisatie	sham therapie+controle dieet	PE challenge
C n=8	PE sensibilisatie	SCIT PE (s.c. 10 ug)+controle dieet	PE challenge
D n=8	PE sensibilisatie	OIT PE (i.g. 1.5 mg)+ controle dieet	PE challenge
E n=8	PE sensibilisatie	Sham therapie+ ■■■ dieet	PE challenge
F n=8	PE sensibilisatie	SCIT PE (s.c. 10 ug)+■■■ dieet	PE challenge
G n=8	PE sensibilisatie	OIT PE (i.g. 1.5 mg)+ ■■■ dieet	PE challenge

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het voedselallergie model is de muis, bijvoorbeeld van de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie (Smit, 2012). Het model voor voedselallergie is een model waar al jaren mee wordt gewerkt binnen de betrokken afdelingen (Smit 2012, Schulz 2012, Van den Elsen 2013, Schouten 2010, van Esch 2011, Schouten 2010). De effecten zijn robuust en zowel in mannelijke als vrouwelijke muizen te zien (Smit, 2012, de Theije 2013).

Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (■■■). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in pre-klinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter (■■■). ■■■ Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekend dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van hetzelfde geslacht zijn. Volgens leverancier Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOuJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken binnen het voedselallergie model is 3200 over een periode van 5 jaar. Naar verwachting zullen we twee allergenen/allergeen-structuren, vier diëten en twee vormen van therapie testen met verschillende doseringen. Per jaar verwachten wij dat er per allergeen 4 studies uitgevoerd kunnen worden om de diëten en therapievormen te testen. Per experiment zullen er ongeveer 80 muizen nodig zijn om alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen. Voor dit type dierexperiment komt dit uit op 5 jaar x 2 allergenen/allergeen-structuren x 4 studies x 80 muizen per studie=3200 muizen voor dit type experiment.

beperken, maar niet voorkomen. Deze test is noodzakelijk om de effectiviteit van de gekozen behandeling vast te stellen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer het welzijn wordt aangetast door een allergische reactie, worden de dieren gedurende deze periode goed in de gaten gehouden en worden lichaamstemperatuur en mobiliteit/gedrag gemeten. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in lichaamstemperatuur of gedragsverandering, wordt besloten het dier te doden.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress
- Symptomen van anafylaxie na blootstelling aan een hoge dosering van het allergeen (challenge)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Vanwege de frequentie van de behandelingen tijdens de immunotherapie fase kunnen zij stress ervaren. Wanneer de dieren maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute, worden behandeld zullen de dieren relatief vaak in een korte periode (2-4 weken) gefixeerd moeten worden en een injectie of gavage moeten ondergaan.
- Kenmerken voor de anafylactische reactie zijn een tijdelijke daling van lichaamstemperatuur en een verminderde mobiliteit en/of alertheid. Deze reactie houdt ongeveer 60 minuten aan.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
- Wanneer anafylaxie optreedt na challenge worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en wordt de lichaamstemperatuur gemeten met een rectale thermometer. Daarnaast wordt gekeken naar mobiliteit/gedrag en alertheid van het dier om de toestand te kunnen inschatten. Wanneer het dier een vooraf vastgestelde grens in lichaamstemperatuurdaling bereikt, wordt het dier op een warmtematje gelegd om het herstel te bevorderen.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een humaan eindpunt kan van toepassing zijn na challenge wanneer de dieren een dusdanige anafylactische shock ervaren dat herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. Het volgende houden wij aan als humaan eindpunt bij anafylaxis: wanneer veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid meer dan 90 min aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en wordt het dier gedood. Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de

muizen in de gaten te houden.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat tussen de 5 en 10% van de dieren kans maakt om na challenge het humane eindpunt te bereiken.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Binnen dit type dierexperiment zal het ongerief van ongeveer 10% van de dieren worden geclassificeerd als licht. Deze dieren worden namelijk sham gesensibiliseerd (met PBS) en zullen geen allergische reactie kunnen ondervinden. Het ongerief van de overige 90% van de dieren kan worden geclassificeerd als matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en vanwege de kort durende anafylactische reactie. De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren die worden gebruikt in dit type dierexperiment zullen na afloop van het experiment worden gedood vanwege de noodzaak om organen en bloed te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

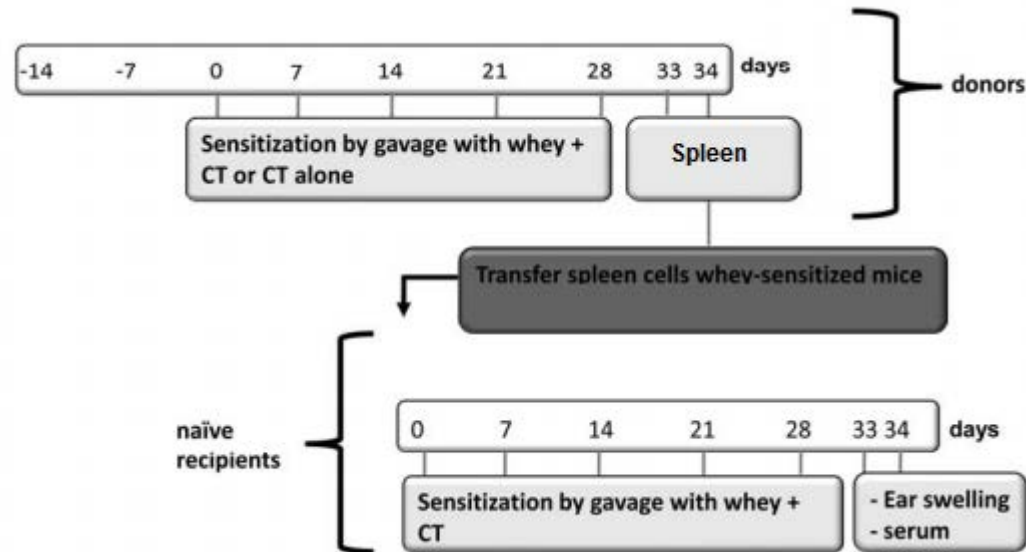
Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

bijvoorbeeld cellulaire veranderingen in het immuunsysteem van het donordier, zal dit effect ook te zien zijn in een (niet behandeld) ontvangstdier na inspuiten van deze cellen.

Voor de transferstudies gebruiken we donordieren, waarvan materiaal (zoals milt, serum, celtypes) wordt verzameld, en ontvangstdieren die worden geïnjecteerd met het materiaal. Een schematisch overzicht van een mogelijke transferstudie is te zien in figuur 1. In deze studie hebben de allergische donordieren een diëetinterventie gehad en wordt onderzocht of een beschermend effect is over te brengen via een transfer van miltcellen naar naïeve ontvangstdieren die vervolgens worden gesensibiliseerd en een challenge ondergaan.

Donormateriaal, zoals een miltsuspensie of serum, van het donordier kan worden overgebracht in het ontvangstdier. Het ontvangstdier is naïef voor het allergeen en kan indien gewenst na de transfer worden gesensibiliseerd óf direct worden blootgesteld aan een (hoge) test dosering van het allergeen om de effectiviteit van de therapie van het donordier vast te stellen. Het transfermateriaal van niet-behandelde donordieren zal in het ontvangstdier, na blootstelling, anafylaxie veroorzaken en naar verwacht zal dit in mindere mate aanwezig zijn bij dieren die het transfermateriaal van immunotherapie donordieren hebben ontvangen. Acute zwelling in de huid van het oor na injectie van het allergeen, het meten van lichaamstemperatuur, het bepalen van de klinische score, het meten van mast cel degranulatie (mMCP-1 levels) en antilichaam levels in serum na verschillende challenges, kunnen gebruikt worden als parameters. Wanneer de allergische response is verlaagd, kan men vaststellen dat er een systemische verandering heeft plaatsgevonden. Met behulp van deze transfer studies kunnen wij onderzoeken welk type behandeling bepaalde systemische veranderingen teweeg brengt.



Figuur 1. Voorbeeld van een schematisch overzicht van een transfer studie (Schouten 2010).

Janecharut T et al, Effects of heterologous helminth infections on passive transfer of immunity using a mouse monoclonal IgE antibody against Schistosoma japonicum Parasitology Research, 1991.

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.

In deze proef zijn er twee verschillende groepen dieren: donordieren en ontvangstdieren.

Donordieren:

- Sensitisatie: het donordier zal worden gesensibiliseerd met het allergeen, door het allergeen oraal toe te dienen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Een alternatieve sensitisatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. alum). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie.
- Therapie: tijdens twee tot vier weken kan de donormuis immunotherapie met het specifieke allergeen krijgen. Dit is een herhaaldelijke behandeling met het allergeen in PBS. Dit kan subcutaan, intragastraal, sublinguaal, epidermaal of een andere route van toediening zijn. De therapie zal 1-5 keer per week gegeven worden afhankelijk van de toedieningsroute.
- Challenge: nadat de donordieren zijn gesensibiliseerd en immunotherapie hebben ondergaan, kunnen zij één of meerdere malen oraal, intraperitoneaal of intradermaal gechallengeed worden met het specifieke allergeen om te meten of de behandeling de acute allergische response heeft verminderd.
- Dieet: de donormuis kan een specifieke dieetinterventie krijgen. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.
- Transfer: na de therapie fase of na de challenge fase wordt materiaal van de donormuizen verzameld, dit kan bijvoorbeeld een cel populatie, weefsel suspensie, eiwit of serum zijn. De challenge is optioneel en dient om te meten of de donordieren een verminderde allergische response hebben na het ondergaan van een bepaalde behandeling. Vervolgens kan het donormateriaal worden overgebracht in de ontvangstdieren. De techniek die zal worden toegepast hangt af van de keuze van materiaal en zal plaatsvinden na sectie van de donordieren.

Ontvangstdieren:

- Transfer: het ontvangstdier zal donormateriaal van het donordier ontvangen via bijvoorbeeld een intraveneuze injectie.
- Sensitisatie: het ontvangstdier kan worden gesensibiliseerd met het allergeen, door het allergeen oraal toe te dienen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Een alternatieve sensitisatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. alum). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie.
- Challenge: nadat de ontvangstdieren zijn gesensibiliseerd en immunotherapie hebben ondergaan, kunnen zij één of meerdere malen oraal, intraperitoneaal of intradermaal gechallengeed worden met het specifieke allergeen om te meten of de transfer de acute allergische response heeft verminderd.
- Dieet: het ontvangstdier kan een specifieke dieetinterventie krijgen. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen, zodat het experiment optimale uitkomsten oplevert. Het minimum aantal dieren wordt bepaald door de opzet van het experiment en is berekend met een sample size berekening per groep. Voor de donordieren zal rekening gehouden worden met de hoeveelheid materiaal nodig om een effect te induceren in het ontvangstdier. Voor de ontvangstgroep is de gekozen parameter in de sample size berekening de belangrijkste parameter voor de allergische response zoals

de acute allergische response na intradermale challenge in het oor. Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groeps grootte op de aantallen die uit de powerberekening komen.

Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling, het schematische overzicht van dit voorbeeld is te zien in figuur 1. (Whey=wei eiwit; SCIT=subcutane immunotherapie; OIT=orale immunotherapie; ■■■ dieet= fructo-oligosacchariden verrijkt dieet):

Donordieren:

A:n=6	PBS sensitisatie	sham therapie+controle dieet
B:n=8	PBS sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+controle dieet
C:n=8	PBS sensitisatie	Sham therapie+ ■■■ dieet
D:n=8	PBS sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+ ■■■ dieet
E:n=8	Whey sensitisatie	sham therapie+controle dieet
F:n=8	Whey sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+ controle dieet
G:n=8	Whey sensitisatie	Sham therapie+ ■■■ dieet
H:n=8	Whey sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+ ■■■ dieet

Ontvangstdieren:

A n=6	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
B n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
C n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
D n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
E n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
F n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
G n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
H n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het voedselallergie model is de muis, bijvoorbeeld van de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie (Smit, 2012). Het model voor voedselallergie is een model waar al jaren mee wordt gewerkt binnen de betrokken afdelingen (Smit 2012, Schulz 2012, Van den Elsen 2013, Schouten 2010, van Esch 2011, Schouten 2010). De effecten zijn robuust en zowel in mannelijke als vrouwelijke muizen te zien (Smit, 2012, de Theije 2013).

Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (■■■ ■■■). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in pre-klinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter (■■■ ■■■). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekent dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van

hetzelfde geslacht zijn. Volgens leverancier Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOuJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken voor de transfer studies is 1600 over een periode van 5 jaar. Naar verwachting zullen we twee allergenen/allergeen-structuren testen en zullen we binnen een experiment variëren met vier diëten en twee vormen van therapie met verschillende doseringen. Per experiment zullen er ongeveer 160 muizen nodig zijn om voor zowel de donorgroep als de ontvangstgroep alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen en de diëten en vormen van therapie te testen (zie voorbeeld groepsindeling). Het overbrengen van donormateriaal naar ontvangstmuizen gebeurt over het algemeen 1 op 1: één donormuis levert celsuspensies of serum voor één ontvangstmuis. Voor dit type dierexperiment komt dit uit op 5 jaar x 2 allergenen/allergeen-structuren x 160 muizen per studie= 1600 muizen voor dit type experiment.

[REDACTED]
Schulz V.J. et al. Aryl hydrocarbon receptor activation affects the dendritic cell phenotype and function during allergic sensitization, Immunobiology, 2013

[REDACTED]
de Theije C.G.M. et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice, Neuropharmacology, 2013.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de

keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen. **Vervanging:** Het voedselallergie model wat de basis vormt voor deze transfer studie is ontworpen om de ontwikkeling en modulatie van voedselallergieën te kunnen onderzoeken en vanwege de complexiteit is het niet mogelijk dit volledig in vitro na te bootsen. De resultaten van de studies met het muismodel voor voedselallergie (3.4.4.1) en de in vitro experimenten met primair materiaal (3.4.4.4) zullen de basis vormen voor het uitvoeren van een transfer experiment.

Wanneer een verandering is te zien in bijvoorbeeld regulatoire T cellen na een bepaalde therapeutische strategie met een dieet en immunotherapie in het muismodel voor voedselallergie, kan gekozen worden voor de transfer van deze factor om de functionaliteit uitgebreider te onderzoeken. Deze keuzes voorafgaand aan een transfer experiment zijn schematisch weergegeven in het figuur in het projectvoorstel bij 3.4.2. **Vermindering:** Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald (zie uitleg punt A). Ook wordt er vooraf bepaald hoeveel donordieren er nodig zijn om de juiste hoeveelheid transfer materiaal over te kunnen brengen in de ontvangstdieren en zo nodig wordt de groepsgrootte daarop aangepast. **Verfijning:** De keuze om deze muissoort te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft de allergeendosering die effectief is maar geen allergische bijwerkingen veroorzaakt tijdens de immunotherapie fase. Het ongerief wat kan optreden na een challenge kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen. Deze test is noodzakelijk om de effectiviteit van de gekozen behandeling vast te stellen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer het welzijn wordt aangetast door een allergische reactie, worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en worden lichaamstemperatuur en mobiliteit/gedrag gemeten. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in lichaamstemperatuur of gedragsverandering, wordt besloten het dier te euthanaseren.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.V.T.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress
- Symptomen van anafylaxie na blootstelling aan een hoge dosering van het allergeen (challenge)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Vanwege de frequentie van de behandelingen tijdens de immunotherapie fase kunnen zij stress ervaren. Wanneer de dieren maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute, worden behandeld zullen de dieren relatief vaak in een korte periode (2-4 weken) gefixeerd moeten worden en een injectie of gavage moeten ondergaan.

- Kenmerken voor de anafylactische reactie zijn een tijdelijke daling van lichaamstemperatuur en een verminderde mobiliteit en/of alertheid. Deze reactie houdt ongeveer 60 minuten aan.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
- Wanneer anafylaxie optreedt na challenge worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en wordt de lichaamstemperatuur gemeten met een rectale thermometer. Daarnaast wordt gekeken naar mobiliteit/gedrag en alertheid van het dier om de toestand te kunnen inschatten. Wanneer het dier een vooraf vastgestelde grens in lichaamstemperatuurdaling bereikt, wordt het dier op een warmtematje gelegd om het herstel te bevorderen.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een humaan eindpunt kan van toepassing zijn na challenge wanneer de dieren een dusdanige anafylactische shock ervaren dat herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. Het volgende houden wij aan als humaan eindpunt bij anafylaxis: wanneer veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid meer dan 90 min aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en wordt het dier geëuthanaseerd. Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat tussen de 5 en 10% van de dieren kans maakt om na challenge het humane eindpunt te bereiken, mits de transfer van donormateriaal hier geen invloed op heeft.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Binnen dit type dierexperiment zal het ongerief van de dieren worden geclassificeerd als matig in zowel de donordieren als de ontvangstdieren. Voor de donordieren is gekozen voor matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen. Zij zullen zelf geen anafylactische reactie ondergaan. Bij de ontvangstdieren is gekozen voor matig vanwege de anafylactische reactie die kort is en waarbij de dieren geen blijvende effecten ondervinden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Donordieren zullen worden geëuthanaseerd zodat donatie mogelijk is, ontvangstdieren zullen na afloop van een experiment worden geëuthanaseerd zodat onderzoek kan worden uitgevoerd in bloed en organen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-----------------|
| 3.4.4.3 | Depletie studie |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Binnen een depletie experiment is het mogelijk om bepaalde celtypes in het dier uit te schakelen zoals de regulatoire T cellen (Fyhrquist 2012). Ook is het mogelijk receptoren zoals de Tachykinin NK1 receptor (De Swert 2004), of eiwitten zoals IFN γ (Stern 2005) of MHCII () te blokkeren in het dier. Op deze manier kan in het model voor voedselallergie (zoals beschreven in 3.4.4.1) gekeken worden naar de specifieke bijdrage van deze factor in het mechanisme van de allergie en de therapie in combinatie met de dieetinterventie. De uitkomstparameters zijn gelijk aan de beschreven parameters van het voedselallergiemodel: voorbeelden hiervan zijn de acute zwelling in de huid van het oor na injectie van het allergeen, het meten van lichaamstemperatuur daling na challenge (anafylaxie) en het geven van een score gebaseerd op uiterlijke symptomen van anafylaxie. Naast klinische parameters kijken we ook

naar cellulaire en humorale parameters die we meten in bloed en organen. Voorbeelden hiervan zijn stoffen zoals histamine (Finkelman, 2007) die vrijkomen na mast cel degranulatie in het serum, antigeen-specifieke antilichamen in het serum en cellen geïsoleerd uit lymf organen en beenmerg.

Depletie kan in de praktijk bereikt worden door knockout muizen te gebruiken, zoals de IFN γ knockout BALB/c muizen (Stern 2005), maar ook door bijvoorbeeld specifieke antilichamen en/of antagonisten in het dier te spuiten die een specifieke target kunnen blokkeren, bijvoorbeeld met behulp van anti-CD25 of anti-CD4 (Schulz 2011). De invloed die het blokkeren heeft op de allergische response, kan inzicht geven in de rol van de target in het tot stand komen van de allergische reactie of de bescherming daartegen.

Fyhrquist N et al, Foxp3+ Cells Control Th2 Responses in a Murine Model of Atopic Dermatitis, Nature, 2012.

De Swert KO et al, The role of the tachykinin NK1 receptor in airway changes in a mouse model of allergic asthma, J Allergy Clin Immunol, 2004 .

Stern ME et al, Role of interferon-gamma in a mouse model of allergic conjunctivitis, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005.

Finkelman FD et al. Anaphylaxis: lessons from mouse models, J Allergy Clin Immunol, 2007.

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.

Voorafgaand aan de studie kunnen bepaalde factoren in de muis geblokkeerd worden door middel van het injecteren van bijvoorbeeld een antilichaam, zoals anti-CD25 of anti-CD4. Een andere optie is dat er knockout muizen worden gebruikt die genetisch gemuteerd zijn. Vanaf de start van het experiment, de sensibilisatie fase, zullen de dieren minimaal 5 en maximaal 8 keer per orale gavage een oplossing van allergeen plus een adjuvant (bijv. cholera toxine) binnen krijgen (één of meerdere gavages per week). Een alternatieve sensitizatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant. Vervolgens krijgen de dieren tijdens de therapie fase gedurende 2-4 weken herhaaldelijk een behandeling met het allergeen in PBS (minimaal 1x per week, maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute). Na de therapie fase volgt een korte periode van rust waarna de dieren worden blootgesteld aan de challenge die via verschillende toedieningsroutes gegeven kan worden. Indien gewenst kan na de challenge lichaamstemperatuur worden gemeten met een rectale thermometer op minimaal 1 en maximaal 8 tijdstippen. De challenge in het oor wordt uitgevoerd onder anesthesie. De dieren zijn maximaal 1 minuut onder anesthesie per meetmoment (maximaal 2 meetmomenten). Indien gewenst kan op bepaalde tijdstippen tijdens het experiment bloed worden afgenomen en kunnen feces monsters worden verzameld. De dieren worden tijdens de feces verzameling voor korte periode apart gehuisvest. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen, zodat het experiment optimale uitkomsten oplevert. Het minimum aantal dieren wordt bepaald door de opzet van het experiment en is berekend met een sample size berekening per groep. Per experiment wordt gekozen voor de belangrijkste parameter. Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen.

Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling, in deze studie kan de functionele rol van de regulatoire T cellen worden bestudeerd door deze cellen uit te schakelen met behulp van een anti-CD25 antilichaam. (PE=pinda eiwit; OIT=orale immunotherapie; ■■■ dieet= fructo-oligosacchariden verrijkt dieet; anti-CD25 mAb= anti-cd25 monoonaal antilichaam; anti-GL113 mAb =controle monoonaal antilichaam):

A n=6	PBS sensitisatie	sham therapie	+controle dieet	PE challenge
B n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	sham therapie	+controle dieet	PE challenge
C n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	sham therapie	+controle dieet	PE challenge
D n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ controle dieet	PE challenge
E n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ controle dieet	PE challenge
F n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	Sham therapie	+ [REDACTED] dieet	PE challenge
G n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	Sham therapie	+ [REDACTED] dieet	PE challenge
H n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ [REDACTED] dieet	PE challenge
I n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ [REDACTED] dieet	PE challenge

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in een knock-out studie is de muis waarbij een specifieke mutatie in het DNA geïmplementeerd is. Als controle kan de wild-type variant gebruikt worden. Voorbeelden van al bestaande knock-out muizenstammen zijn de MHC class II-deficiente ($A\beta^{\circ/\circ}$) muis, de DEREK muis [REDACTED] of de korte-keten vetzuur receptor GPR41-knockout muis (Trompette 2013). Er zullen geen nieuwe knock-out stammen worden ingezet binnen deze aanvraag. Voor de depletie studies waar gebruik wordt gemaakt van bijvoorbeeld antilichamen, gebruiken we de muis van bijvoorbeeld de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf.

Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie ([REDACTED]). Het model voor voedselallergie is een model waar al jaren mee wordt gewerkt binnen de betrokken afdelingen ([REDACTED]). De effecten zijn robuust en zowel in mannelijke als vrouwelijke muizen te zien ([REDACTED]).

Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (Kelly [REDACTED]). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in pre-klinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter ([REDACTED]). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekent dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van hetzelfde geslacht zijn. Volgens leverancier Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOuJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken voor de depletie studies is 800 over een periode van 5 jaar. Naar verwachting zullen we twee allergenen/allergeen-structuren testen en zullen we binnen een experiment variëren met vier diëten en twee vormen van therapie met verschillende doseringen. Per experiment zullen er ongeveer 80 muizen nodig zijn om alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen en de diëten en vormen

van therapie te testen (zie voorbeeld van groepsindeling). Voor dit type dierexperiment komt dit uit op 5 jaar x 2 allergenen/allergeen-structuren x 80 muizen per studie= 800 muizen voor dit type experiment.

[REDACTED]
Trompette A et al, Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nature medicine. 2013

[REDACTED]
de Theije C.G.M. et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice, Neuropharmacology, 2013.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging: Bij deze depletie studies wordt gekeken naar het effect van het blokkeren van één specifieke factor op het functioneren van het complete immuunsysteem tijdens voedselallergie. Vanwege de complexiteit is het niet mogelijk het gehele allergie proces in vitro na te bootsen. De immuun cellen in de darmen, de slijmvliezen in de mond, de huid, maar ook de cellen die in de bloedbaan voorkomen of in de lymph organen verblijven, spelen allemaal een rol. De complexiteit van het geheel kan tot dusver nog niet worden nagebootst in een alternatief model en daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk. Vooraf kan in vitro onderzocht worden welke factor een rol speelt en dus interessant is om met behulp van een depletiestudie te onderzoeken.

Daarnaast zal de kennis verkregen uit het voedselallergiemodel zelf en ook resultaten uit de transferstudie essentieel zijn om een depletiestudie te onderbouwen (zie ook schema projectvoorstel 3.4.2). **Vermindering:** Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groeps grootte exact berekenen. **Verfijning:** De keuze om deze muissoort(en) te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft de allergeendosering die effectief is maar geen allergische bijwerkingen veroorzaakt tijdens de immunotherapie fase. Het ongerief wat kan optreden na een challenge kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen. Deze test is noodzakelijk om de effectiviteit van de gekozen behandeling vast te stellen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer het welzijn wordt aangetast door een allergische reactie, worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en worden lichaamstemperatuur en mobiliteit/gedrag gemeten. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in lichaamstemperatuur of gedragsverandering, wordt besloten het dier te euthanaseren. Voordat een bepaalde factor wordt geblokkeerd via bijvoorbeeld antilichamen zal eerst bestudeerd worden of het dier ongerief zal ondervinden van deze aanpassing.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress
- Symptomen van anafylaxie na blootstelling aan een hoge dosering van het allergeen (challenge)
- Defect in immuunsysteem

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Vanwege de frequentie van de behandelingen tijdens de immunotherapie fase kunnen zij stress ervaren. Wanneer de dieren maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute, worden behandeld zullen de dieren relatief vaak in een korte periode (2-4 weken) gefixeerd moeten worden en een injectie of gavage moeten ondergaan.
- Kenmerken voor de anafylactische reactie zijn een tijdelijke daling van lichaamstemperatuur en een verminderde mobiliteit en/of alertheid. Deze reactie houdt ongeveer 60 minuten aan.
- Het uitschakelen van bepaalde factoren in het immuunsysteem die bijdragen aan de ontwikkeling van allergie/induceren van tolerantie kan nadelige effecten hebben voor het dier.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
- Wanneer anafylaxie optreedt na challenge worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en wordt de lichaamstemperatuur gemeten met een rectale thermometer. Daarnaast wordt gekeken naar mobiliteit/gedrag en alertheid van het dier om de toestand te kunnen inschatten.

Wanneer het dier een vooraf vastgestelde grens in lichaamstemperatuurdaling bereikt, wordt het dier op een warmtematje gelegd om het herstel te bevorderen.

- Er zal allereerst gekeken worden of er eerdere studies zijn gedaan waarbij de gekozen factor is uitgeschakeld en wat voor effect dit had op het dier. Wanneer de uitkomst van een bepaalde depletie onzeker is, kunnen we het eerst testen in een pilot experiment met een beperkt aantal dieren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een humaan eindpunt kan van toepassing zijn na challenge wanneer de dieren een dusdanige anafylactische shock ervaren dat herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. Het volgende houden wij aan als humaan eindpunt bij anafylaxis: wanneer veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid meer dan 90 min aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en wordt het dier geëuthanaseerd. Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat tussen de 5 en 10% van de dieren kans maakt om na challenge het humane eindpunt te bereiken, mits de aard van de knock-out/depletie hier geen verdere invloed op heeft.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Binnen dit het voedselallergie model zal het ongerief van ongeveer 10% van de dieren worden geclassificeerd als licht. Deze dieren worden namelijk sham gesensitiseerd (met PBS) en zullen geen allergische reactie kunnen ondervinden. Het ongerief van de overige 90% van de dieren kan worden geclassificeerd als matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en vanwege de kort durende anafylactische reactie.

De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie. Het ongerief van de knock-out/depletie dieren dient te worden geschat wanneer bekend is wat de aard van de blokkade zal zijn. Dit zal worden afgestemd met de IvD voor aanvang van een experiment.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren die worden gebruikt in dit type dierexperiment zullen na afloop van het experiment worden gedood vanwege de noodzaak om organen en bloed te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.4	Donor studie

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Om mechanistische kennis te verkrijgen betreffende immuun-modulatie via voedingssupplementen kunnen *in vitro* experimenten van groot belang zijn. De werkzaamheid van deze voedingssupplementen, zoals meervoudig onverzadigde vetzuren (van den Elsen, 2013), prebiotica zoals oligosacchariden, probiotica en/of specifieke combinaties hiervan (Gourbeyre, 2011)(Schouten, 2009) kan bijvoorbeeld getest worden op humane cellijnen zoals de HT-29 darmepitheel cellijn en/of humane PBMCs (de Kivit, 2013). Zo kan er gekeken worden of de effecten die in het muismodel voor voedselallergie naar voren komen, ook te zien zijn bij humane cellijnen. Daarnaast kunnen primaire cellen zoals T cellen en dendritische cellen (DC) uit donordieren worden gebruikt om de werkzaamheid en het mechanisme te onderzoeken in een *in vitro* setting. Als uitleesparameter kan er bijvoorbeeld gekeken worden naar het percentage regulatoire T cellen

wat in de kweek aanwezig is na blootstelling aan de voedingscomponenten. Een ander voorbeeld van een uitleesparameter is de proliferatie van T cellen of de productie van cytokines door T cellen die worden geassocieerd met tolerantie. Voorbeelden van materiaal wat uit donordieren kan worden geïsoleerd zijn beenmerg cellen, darmepitheel (organoids), serum eiwitten of immuun cellen uit bloed of organen. Voor dit type experiment zijn kleine hoeveelheden dieren nodig. Waar mogelijk wordt ernaar gestreefd dat donormateriaal wordt verkregen uit surplus dieren of dieren die bijvoorbeeld in een ander experiment een controle dier waren.

Ter verduidelijking een voorbeeld van een *in vitro* experiment waar gebruik wordt gemaakt van donormateriaal: de DC/T cel interactie assay (Smit, 2015). De mate van allergeniciteit van een toegevoegd allergeen wordt bepaald door te bestuderen hoe DCs het allergeen presenteren aan naïeve T cellen en welke type T cellen daarna te vinden zijn in de kweek. Daarnaast kan een *in vitro* model worden gebruikt om te begrijpen wat het effect van dieetcomponenten is op deze interactie tussen DCs en T cellen. Dendritische cellen kunnen in dit model tegelijkertijd worden blootgesteld aan allergenen en verschillende voedingscomponenten met een immuun-modulerende werking. Wanneer veranderingen optreden in T cel populaties en/of de productie van cytokines kan dit een aanwijzing zijn voor het werkingsmechanisme van de componenten in een *in vivo* experiment. Voor het verkrijgen van precursor dendritische cellen is beenmerg van naïeve muizen nodig. Om allergeen-specifieke T cellen te krijgen, worden bijvoorbeeld de milt of lymfeknopen van gesensibiliseerde muizen gebruikt om T cellen uit te isoleren. Het sensibiliseren van donordieren vindt plaats door het allergeen in te spuiten in combinatie met een adjuvant (zoals alum). Een alternatieve sensibilisatie methode is het oraal toedienen van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie. Ook andere celtypen naast T cellen en DCs kunnen worden gebruikt (mast cellen, neutrofielen etc) om bepaalde interacties tussen het immuunsysteem en het allergeen te bestuderen.

Ten slotte kan het serum van gesensibiliseerde muizen die geen therapie hebben ondergaan een belangrijke bron vormen voor allergeen-specifieke antilichamen zoals IgE, IgG1, IgG2a en IgA. Dit serum kunnen we gebruiken in bijvoorbeeld een ELISA om een titratie curve te maken en aan de hand daarvan antilichaam concentraties in serum samples van de behandelde dieren te meten.

Van den Elsen LW et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. Clin Exp Allergy. 2013

Gourbeyre P et al, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. J Leukoc Biol. 2011

Schouten B et al, Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. J Nutr. 2009

de Kivit S et al, Intestinal Epithelium-Derived Galectin-9 Is Involved in the Immunomodulating Effects of Nondigestible Oligosaccharides. J Innate Immun. 2013

Smit JJ et al, Heterogeneous responses and cross reactivity between the major peanut allergens Ara h 1, 2,3 and 6 in a mouse model for peanut allergy. Clin Transl Allergy. 2015

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.

Bij binnenkomst is er een acclimatisatie periode, vervolgens zullen de dieren worden geëuthanaseerd om het donormateriaal te verzamelen (beenmerg, darmbiopten etc). Materiaal wat allergeen-specifiek moet zijn wordt verzameld nadat de muizen gesensibiliseerd zijn. Het sensibiliseren van donordieren vindt plaats door het allergeen in te spuiten in combinatie met een adjuvant (bijv. alum). Een alternatieve sensitisatie methode is het oraal toe doen van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie. Dit kan ingespoten worden of oraal gedoseerd worden. Vervolgens worden de dieren gedood en worden de organen geïsoleerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Afhankelijk van het benodigde donormateriaal wordt bepaald hoeveel donordieren nodig zijn. Door ervaring met *in vitro* experimenten is bekend hoeveel

materiaal er maximaal uit één muis geïsoleerd kan worden. Aan de hand hiervan kan berekend worden hoeveel dieren er per experiment gebruikt dienen te worden. Voorafgaand aan het experiment zal bepaald worden welke experimentele- en controle condities er worden onderzocht en hoeveel cellen of weefsels daarvoor nodig zijn. We baseren de groepsgrootte dus hoofdzakelijk op de hoeveelheid donormateriaal wat nodig is om betrouwbare resultaten te krijgen. Het gebruik van dieren in dit type experiment zal zoveel mogelijk worden beperkt door waar mogelijk surplus dieren te gebruiken. Vanwege de aard van het experiment is het dus niet mogelijk een powerberekening uit te voeren om de groepsgrootte te bepalen.

Ter verduidelijking een voorbeeld situatie met bijbehorende groepen:

DC/T cel interactie assay:

Groep A: n=1-2 > deze naïeve muis(en) wordt(en) gebruikt om beenmerg te isoleren en hier worden vervolgens DCs uit gekweekt

Groep B: n=4-8 > deze muizen worden gebruikt om allergeen-specifieke T cellen te isoleren uit de milt nadat ze volgens het beschreven sensitisatie protocol allergisch zijn geworden voor het allergeen. De hoeveelheid experimentele- en controle condities in de assay bepaalt het exacte aantal donordieren dat nodig is in de allergische donorgroep.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Het type diersoort dat zal worden gebruikt is de muis, bijvoorbeeld van de C3H/HeOJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie (Smit, 2012). Daarom is deze muis een geschikte donor voor bijvoorbeeld allergeen-specifieke cellen die gebruikt kunnen worden in een *in vitro* experiment. Het geslacht van de donormuizen is minder relevant wanneer bijvoorbeeld serum wordt verzameld of cellen uit naïeve dieren. Wanneer we geïnteresseerd zijn in specifieke T cel reacties is het raadzaam om donormateriaal van vrouwelijke muizen te verzamelen, zodat het sensibiliseren vergelijkbaar verloopt en we de vergelijking kunnen maken met resultaten uit *in vivo* experimenten.

Wij verwachten dat de volgende typen donormateriaal nodig zullen zijn; serum (voor antilichamen), darmepitheel (organoids), beenmerg (voor o.a. DCs en mast cellen) en allergeen-specifieke T cellen uit de milt of de MLN.

Het benodigde serum om de titratiecurves te kunnen maken komt neer op 2 donordieren per *in vivo* experiment zoals deze zijn beschreven in 3.4.4.1 – 3.4.4.3.

Voor de *in vitro* assays verwachten wij 4 voedings-supplementen en/of combinaties daarvan te testen in combinatie met 2 allergenen/allergeenstructuren. Het aantal dieren per experiment komt neer op gemiddeld 2 naïeve dieren en gemiddeld 6 gesensibiliseerde dieren. We verwachten dat er 20 experimenten nodig zijn om de voedingscomponenten en allergenen/allergeen-structuren in verschillende combinaties en doseringen te testen. Het verzamelen van darmepitheel nemen we niet mee in de berekening, omdat het volstaat dat dieren gebruikt worden uit de *in vivo* experimenten zoals beschreven in 3.4.4.1 – 3.4.4.3. Dit geeft de volgende schatting voor het totaal aantal benodigde donordieren:

100 dieren voor serum donatie + (8 dieren x 20 *in vitro* experimenten) = 260 donordieren over een periode van 5 jaar

Smit J.J. et al. Contribution of Classic and Alternative Effector Pathways in Peanut-Induced Anaphylactic Responses, Plos One, 2012.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen. **Vervanging:** het testen van allergenen/allergeenstructuren en voedingscomponenten aan de hand van donormateriaal in een *in vitro* assay kan ervoor zorgen dat bijvoorbeeld een (pilot) *in vivo* experiment niet nodig zal zijn. Deze aanpak zal kennis opleveren betreffende de potentie en het mechanisme van voedingssupplementen in het proces van tolerantie inductie. **Vermindering:** Het aantal dieren wordt bepaald door de opzet van het experiment, hiermee wordt bepaald hoeveel donormateriaal er nodig is om alle gewenste experimentele- en controle condities te testen. Het gebruik van deze donordieren zal leiden tot minder diergebruik in de *in vivo* experimenten omdat nieuwe condities eerst *in vitro* op donormateriaal getest kunnen worden. **Verfijning:** Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel testmethoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. We gebruiken een muizensoort in deze studies die een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem heeft en ook gevoelig is voor de inductie van voedselallergie zodat allergeen-specifieke cellen kunnen worden gebruikt.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Doordat er slechts een klein aantal donordieren per experiment nodig is, is er kans op solitaire huisvesting wanneer er bijvoorbeeld slechte één naïef dier nodig is om beenmerg te isoleren. Door rekening te houden met de planning, zal ervoor gezorgd worden dat solitaire huisvesting zoveel mogelijk wordt beperkt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Eventuele stress kan ontstaan door solitaire huisvesting.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd dieren zo min mogelijk en zo kort mogelijk solitair te huisvesten.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Doordat de donordieren relatief kort in een proef zitten en weinig tot geen behandelingen zullen ondergaan zal het cumulatief ongerief worden geclassificeerd als licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Om het donormateriaal te verzamelen waar vervolgens experimenten mee worden gedaan *in vitro* is het nodig de dieren te doden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Voedselallergie is een belangrijk maatschappelijk probleem, dat voorkomt bij ongeveer 2-3% van de bevolking. Er is geen effectieve en veilige therapie beschikbaar. De huidige strategie bestaat uit het behandelen van symptomen en het vermijden van het allergeen in de dagelijkse voeding. De symptomen kunnen variëren van mild tot zeer ernstig en kunnen zelfs een fatale afloop hebben voor de patiënt. Immunotherapie is een behandelmethode voor voedselallergie waarbij patiënten worden blootgesteld aan gecontroleerde hoeveelheden van het allergeen om de reactiviteit van het immuunsysteem op het allergeen te verminderen. De allergenen kunnen via verschillende routes worden toegediend.

Recente resultaten van subcutane en orale behandelingen met allergenen in de mens zijn veelbelovend. Deze behandelingen gaan echter (te) vaak gepaard met allergische bijwerkingen, en/of lijken geen tolerantie te induceren die bescherming geeft op de lange termijn (Kostadinova, 2013)(Vickery, 2009)(Yeung, 2012). In onze eigen studies hebben we in een pinda- en koemelkallergiemodel subcutane en orale immunotherapie toegepast. Beide vormen van immunotherapie geven bescherming tijdens een acute allergische reactie en veroorzaken tevens veranderingen in het humorale en cellulaire immuunsysteem. Hoewel we hebben vastgesteld dat immunotherapie de potentie heeft om de voedselallergie te onderdrukken op de korte termijn (desensibilisatie), kunnen wij nog niet vaststellen dat er bescherming op de lange termijn optreedt (tolerantie). Deze vraag in combinatie met het niet verlagen van alle allergische parameters (bijv. IgE) tijdens de therapie, zijn een belangrijke reden om het onderzoek voort te zetten en te onderzoeken óf en hoe tolerantie inductie tijdens immunotherapie ondersteund kan worden en de kans op bijwerkingen wordt verlaagd. Om dit vraagstuk te kunnen beantwoorden hebben we ons verdiept in voedingssupplementen met immuunmodulerende werking en willen we onderzoeken of deze supplementen de immunotherapie kunnen optimaliseren.

In vitro studies, studies in diermodellen en studies in kinderen gericht op preventie van atopische dermatitis (Arslanoglu, 2012), suggereren dat toevoeging van voedingssupplementen in het dieet de effectiviteit van therapeutische benaderingen zoals immunotherapie zou kunnen verbeteren en het aantal bijwerkingen zou kunnen verminderen. Voorbeelden van deze voedingssupplementen zijn meervoudig onverzadigde vetzuren (██████████), prebiotica zoals oligosacchariden, probiotica en/of specifieke combinaties hiervan (Gourbeyre, 2011)(██████████). Wij verwachten van dit onderzoek dat de immuunmodulerende werking van deze supplementen een positieve bijdrage kan leveren aan het proces van tolerantie inductie, wat uiteindelijk ervoor zorgt dat de allergische response op een efficiënte manier wordt onderdrukt en de patiënt langdurig wordt beschermd. Daarnaast verwachten wij dat de kans op bijwerkingen tijdens immunotherapie wordt vermindert.

Het is nog niet mogelijk om het proces van voedselallergie inductie en modulatie volledig na te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie en tolerantie inductie voor voedselallergenen bestudeerd kan worden (██████████). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van adjuvantia, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na het beschreven sensibilisatie protocol laten de muizen manifestaties van voedselallergie zien zoals we die ook in patiënten

zien. Er ontwikkelen zich allergeen-specifieke T cellen, de hoeveelheid specifieke IgE antilichamen neemt toe, er is mest cel degranulatie na challenge meetbaar en er kan een anafylactische reactie gemeten worden aan de hand van lichaamstemperatuur en klinische symptomen (Li 2000-1). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar therapeutische mogelijkheden voor het behandelen van voedselallergie. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de immunotherapie in combinatie met de immuunmodulerende voedingssupplementen kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is.

Tijdens het opstellen van het projectvoorstel om fondsen te werven is er een uitgebreide literatuur screening gedaan om vast te stellen welke experimenten al zijn uitgevoerd in het immunotherapie veld en welke vragen nog beantwoord dienen te worden voordat de strategie de stap zou kunnen maken naar de kliniek. Het testen van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van de genoemde therapiecombinatie in een diermodel en het onderzoeken van het mechanisme zal hieraan bijdragen. Vanwege het grote aantal partners wat betrokken is bij dit project en hun uitgebreide netwerk en samenwerkingsverbanden, kunnen wij vaststellen dat de beschreven strategie in deze aanvraag nieuw is. Betrokken partners bij dit project zijn o.a. Universiteit Utrecht, UMC Utrecht, Danone/Nutricia Research en TNO. Het project wordt gefinancierd door het STW open technologie programma.

[REDACTED]
Vickery BP et al, Immunotherapy in the treatment of food allergy: focus on oral tolerance. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009

Yeung JP et al, Oral immunotherapy for milk allergy. *Cochrane Database of systematic reviews*. 2012

1-Li XM et al, A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000

2-Li XM et al, A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000

Arslanoglu S et al, Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012

Gourbeyre P et al, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol*. 2011

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het hoofddoel van dit project is het verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen. Tevens willen wij het werkingsmechanisme van de genoemde combinatie onderzoeken. Dit project bestaande uit pre-klinische dier- en *in vitro* experimenten zal fundamentele kennis opleveren die in de toekomst mogelijk kan bijdragen aan vervolgonderzoek en het testen van de genoemde strategie in een klinische studie. Binnen de projectduur van 5 jaar is deze doelstelling realistisch en haalbaar vanwege de uitgebreide expertise die binnen de projectgroep aanwezig is aangezien onderzoekers, artsen en bedrijven samenwerken (zie partners sectie 3.1). De verschillende partners die deelnemen aan dit project brengen allen specifieke kennis en ervaring mee die de uitvoering van de experimenten ten goede komt. Vanwege het voorbereidende onderzoek naar immuunmodulatie via voedingssupplementen wat voorafgaand aan dit project is uitgevoerd, wordt verwacht dat het hoofddoel haalbaar is. Voorbeelden van voedingssupplementen uit eerder onderzoek zijn meervoudig onverzadigde vetzuren,

prebiotica, probiotica en/of combinaties ervan (Rijnierse, 2011)(van den Elsen, 2013)(Gourbeyre, 2011)(Schouten, 2009).

Rijnierse A et al, Food-derived oligosaccharides exhibit pharmaceutical properties Eur J Pharmacol. 2011

Van den Elsen LW et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. Clin Exp Allergy. 2013

Gourbeyre P et al, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. J Leukoc Biol. 2011

Schouten B et al, Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. J Nutr. 2009

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Tot dusver bestaan er geen geschikte therapieën voor patiënten, zowel volwassenen als kinderen, met voedselallergieën. Het onderzoek dat zal worden uitgevoerd aan de hand van deze aanvraag, zal wetenschappelijke kennis opleveren betreffende de effectiviteit van allergeen-specifieke immunotherapie in combinatie met een dieetinterventie in diermodellen. Ook zal kennis verkregen worden over de mogelijkheid om eventuele bijwerkingen van immunotherapie te verminderen met behulp van de dieetinterventie. Daarnaast zal het onderzoek meer inzicht geven in het werkingsmechanisme van de therapie in combinatie met de immuunmodulerende voedingscomponenten. Het in kaart brengen van de cellulaire en humorale veranderingen die worden geïnduceerd door de toegepaste behandelingen, zal bijdragen aan de optimalisering van de strategie in diermodellen. In de toekomst verwachten wij dat deze fundamentele kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van een therapie bij mensen.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Binnen dit project zal onderzocht worden of immuunmodulerende voedingssupplementen, antigeen-specifieke immunotherapie kunnen optimaliseren in diermodellen. De onderzoeksstrategie is onder te verdelen in twee verschillende gedeeltes die gezamenlijk de hoofddoelstelling kunnen bereiken.

1. Het vaststellen van de effectiviteit/het verminderen van bijwerkingen van de therapeutische strategie:

Het eerste deel van de onderzoeksstrategie is gericht op het vaststellen van de effectiviteit van de allergeen-specifieke therapie in combinatie met een bepaalde dieetinterventie. Bepaald moet worden welke therapeutische aanpak een effect heeft op de acute allergische response en/of tolerantie inductie tegen het allergeen. Daarnaast zal onderzocht worden welke therapeutische aanpak eventuele bijwerkingen van de immunotherapie verminderd.

2. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de therapeutische strategie:

Wanneer is vastgesteld welke specifieke therapeutische aanpak effectief en met minder bijwerkingen kan worden toegepast in diermodellen, zullen wij het onderzoek verder toespitsen op het werkingsmechanisme. Inzicht in specifieke veranderingen die optreden op cel-, eiwit- en DNA niveau levert wetenschappelijke kennis op die in de toekomst een bijdrage zou kunnen leveren aan vervolgonderzoek en aan het testen van de strategie in een klinische studie. Om het werkingsmechanisme in de mens tevens uit te diepen zal parallel aan dit onderzoek in diermodellen, aanvullend humaan *in vitro* onderzoek worden uitgevoerd in een apart AiO project. De *in vitro* modellen zijn gebaseerd op combinaties van humane darmepitheelcellijnen en bloedcellen uit gezonde personen en allergische patiënten. Immun cellen verkregen van allergische patiënten zullen al dan niet in combinatie met darmepitheelcellen worden blootgesteld aan de voedingssupplementen, zodat er gekeken kan worden of deze supplementen effect hebben op de cellulaire response en wat het immunologische mechanisme is. De verkregen resultaten worden binnen het consortium besproken en kunnen bijdragen aan de verfijning en bijstellen van het onderzoek in diermodellen en in de toekomst ook aan de translatie van de strategie naar een klinische studie. De betrokkenheid van

onderzoekers/artsen van het academisch ziekenhuis (UMC) met ervaring in voedselallergie biedt het consortium de mogelijkheid om de experimentele bevindingen uit het *in vitro* en dieronderzoek in de toekomst naar studies in de mens te vertalen.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

1. Het vaststellen van de effectiviteit/veiligheid van de therapeutische strategie:

Voor dit onderdeel wordt uitgegaan van het al bestaande **muismodel voor voedselallergie** (Schouten 2008)(Smit 2012). Dit type experiment bestaat uit 3 verschillende fasen. In de eerste fase worden de naïeve muizen gesensibiliseerd met het allergeen zodat de voedselallergie ontstaat. In de tweede fase vindt de immunotherapie plaats door het herhaaldelijk toedienen van een bepaalde dosering van het allergeen met of zonder een dieetinterventie. In de derde fase worden de muizen blootgesteld aan een hoge dosering van hetzelfde allergeen (challenge) om de effectiviteit van de therapie vast te stellen.

Onderstaande thema's beschrijven welke aspecten binnen dit type experiment gevarieerd kunnen worden om zo een optimale therapeutische benadering te ontwikkelen:

- **Type allergeen:** Een voedselallergie kan door verschillende allergenen worden veroorzaakt en daardoor kan het verloop van de allergie afwijken. Voorbeelden van allergenen zijn wei of caseïne eiwitten uit koemelk (Schouten 2008), pinda eiwitten (Smit, 2015) en kippenei eiwitten (Hogenkamp, 2015). Daarnaast kunnen bepaalde allergenen bijvoorbeeld meer voorkomen bij kinderen vergeleken met volwassenen en vice versa. Om de immunotherapie zo breed mogelijk te kunnen toepassen zal in deze aanvraag gebruik worden gemaakt van verschillende relevante allergenen of allergeencombinaties.
- **Type allergeen structuur:** Om een allergische response in gang te zetten, dient het allergeen van interesse opgenomen en gepresenteerd te worden door antigeen-presenterende cellen aan T-cellen. De structuur van het eiwit speelt hierbij een essentiële rol aangezien de keten van aminozuren een exacte opbouw dient te hebben om te kunnen worden herkend. Wanneer een intact eiwit wordt opgenomen, zal de allergische response volgen. Het is daarom relevant om te onderzoeken of immunotherapie veiliger en/of effectiever kan worden gemaakt door de eiwitstructuur dusdanig aan te passen dat een allergische response wordt voorkomen terwijl het proces van tolerantie inductie doorgang vindt. Naast heel eiwit kan gebruik gemaakt worden van eiwitfragmenten of specifieke peptiden die worden herkend door T-cellen, maar geen allergische response kunnen veroorzaken (Meulenbroek 2013).
- **Type immunotherapie:** Uit eerder onderzoek is gebleken dat immunotherapie kan worden uitgevoerd via verschillende toedieningsroutes (Kostadinova 2013). De allergenen kunnen bijvoorbeeld oraal, subcutaan, sublinguaal of epidermaal worden toegediend om zo de target cellen van het immuun systeem te bereiken. Om de meest effectieve methode te vinden, zullen we binnen dit project meerdere toedieningsroutes gebruiken in de experimenten. Het bepalen van de meest optimale route zal afhangen van de effectiviteit ervan in combinatie met de immuun-modulerende voedingssupplementen.
- **Type voedingssupplement:** Uit eerder onderzoek is gebleken dat het immuunsysteem gemoduleerd kan worden door componenten in de voeding. Er zijn niet-verteerbare suikers (prebiotica) (Nauta 2013), vitaminen (Ruhl, 2007), meervoudig onverzadigde vetzuren (van den Elsen, 2013) en ook bacteriën (probiotica)(Castellazzi, 2013) geïdentificeerd, die een bijdrage kunnen leveren aan de optimale werking van het immuunsysteem. Tijdens een voedselallergie is het proces van natuurlijke tolerantie verstoord en reageert het immuun systeem op de aanwezigheid van de allergenen in de voeding. Door de immuun-modulerende componenten toe te voegen aan het dieet wordt getracht het proces van tolerantie inductie tijdens de immunotherapie te ondersteunen. Om de meest optimale supplementen te selecteren zullen meerdere componenten en/of combinaties getest worden in de huidige aanvraag.

Schouten B et al, Acute allergic skin reactions and intestinal contractility changes in mice orally sensitized against casein or whey. IAAI . 2008

Smit JJ et al, Contribution of Classic and Alternative Effector Pathways in Peanut-Induced Anaphylactic Responses, Plos One, 2012.

Smit JJ et al, Heterogeneous responses and cross reactivity between the major peanut allergens Ara h 1, 2,3 and 6 in a mouse model for peanut allergy. Clin Transl Allergy. 2015

Hogenkamp A et al, Supplementation of Mice with Specific Nondigestible Oligosaccharides during Pregnancy or Lactation Leads to Diminished Sensitization and Allergy in the Female Offspring. J Nutr. 2015

Meulenbroek LA et al, Oral treatment with beta-lactoglobulin peptides prevents clinical symptoms in a mouse model for cow's milk allergy. PAI. 2013

Kostadinova AI et al, Immunotherapy – risk/benefit in food allergy. PAI. 2013

Nauta AJ and Garssen J. Evidence-based benefits of specific mixtures of non-digestible oligosaccharides on the immune system. Carbohydr Polym. 2013

Ruhl R et al, Role of vitamin A elimination or supplementation diets during postnatal development on the allergic sensitisation in mice. Mol Nutr Food Res. 2007

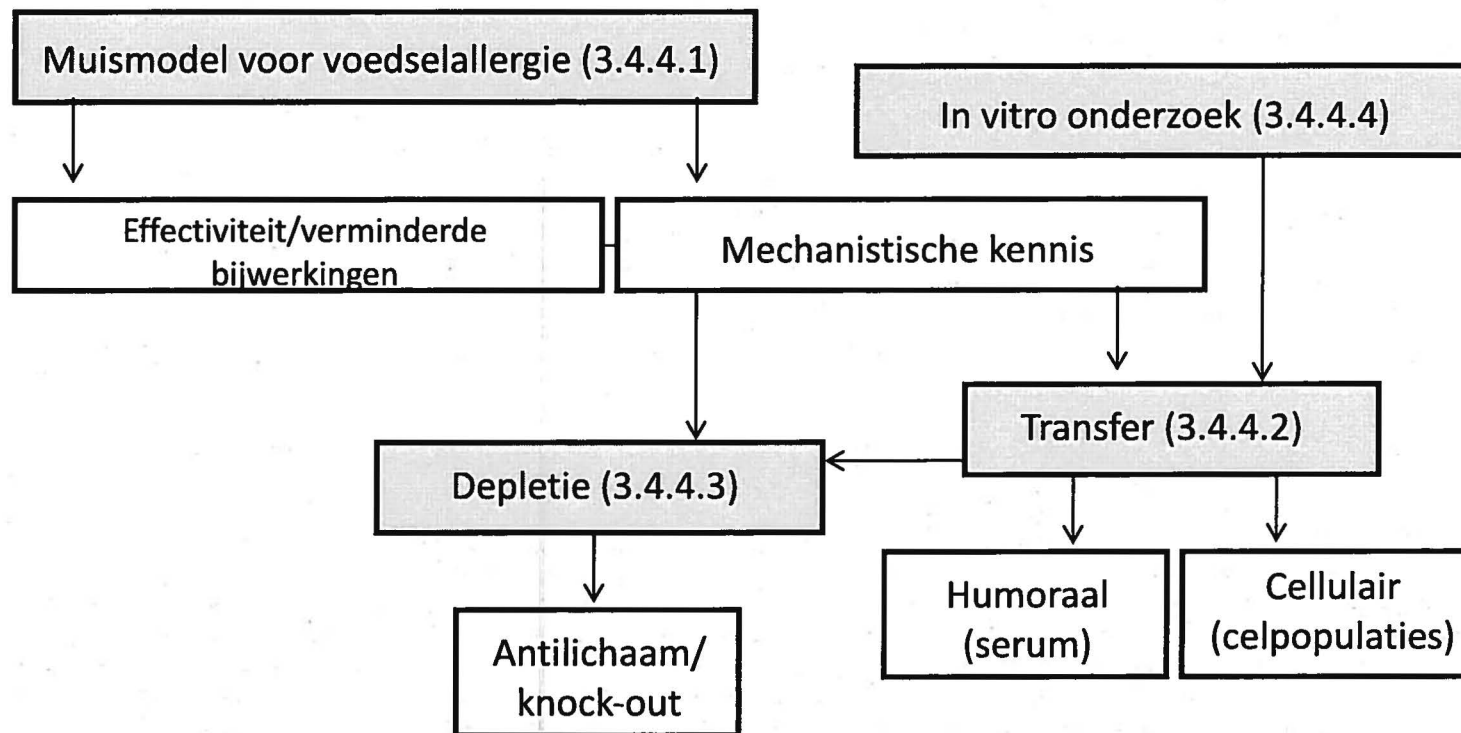
Van den Elsen LW et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. Clin Exp Allergy. 2013

Castellazzi AM et al, Probiotics and food allergy. Ital J Pediatr. 2013

2. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de therapeutische strategie:

Om deel 2 van de onderzoeksstrategie uit te voeren wordt eveneens gebruik gemaakt van type dierexperiment **muismodel voor voedselallergie** zoals hierboven is beschreven. Tijdens de verschillende fasen van het experiment (sensitisatie, immunotherapie en challenge) kunnen immunologische parameters zoals mast cel degranulatie markers (mouse Mast Cell Protease-I en histamine), T cel populaties (T helper 1 cellen en regulatoire T cellen) en serum immunoglobulinen (IgE en IgG1) (Schouten 2008) (Jo, 2014) worden onderzocht in bloed, organen zoals de milt en lymfeknopen en/of andere lichaamsvloeistoffen. Daarnaast wordt er gebruik gemaakt van 3 variaties op het voedselallergie model: het type **transfer studie**, het type **depletie studie** en het type **donor studie**. Deze typen experiment kunnen een bijdrage leveren aan het onderzoek naar de mechanistische achtergrond van de effecten die we verwachten te vinden met het muismodel voor voedselallergie. Hieronder staan deze typen dierexperiment beschreven en daarnaast hebben wij een schematisch overzicht toegevoegd om aan te geven hoe de verschillende typen experimenten zich onderling verhouden:

- **Transfer studie:** Binnen een transfer experiment is het mogelijk om bepaalde celpopulaties zoals CD4+CD25+ regulatoire T cellen geïsoleerd uit de milt (van den Elsen, 2013) (Schouten, 2010) of mesenterische lymfeknopen (van Esch, 2011), of bijvoorbeeld supernatant van in vitro gestimuleerde milt cellen (Schouten, 2010) of antilichamen in serum (Murphy, 2014) (Kanjarawi, 2013), van een donor dier over te brengen naar een ontvanger dier. Deze strategie geeft de onderzoeker de mogelijkheid om te testen of een bepaalde bescherming tegen de allergie wordt veroorzaakt door deze specifieke factoren. Het donor dier ondergaat de behandeling en na de transfer wordt het ontvanger dier blootgesteld aan de (hoge) dosering van het allergeen. Wanneer de allergische response is verlaagd, kan men vaststellen dat de overgebrachte factor hierbij een rol heeft gespeeld. De aard van de transfer wordt bepaald aan de hand van resultaten uit het muismodel voor voedselallergie en in vitro onderzoek met primair materiaal (zie schema).
- **Depletie studie:** Binnen een depletie experiment is het mogelijk om bepaalde factoren te blokkeren of te verwijderen in een dier. Dit kan in de praktijk bereikt worden door mutaties in het DNA (knock-outs) van het dier te veroorzaken zoals de korte-keten vetzuur receptor GPR41-knockout muis (Trompette 2013), maar ook door bijvoorbeeld specifieke antilichamen en/of antagonisten in het dier te spuiten die een specifiek target kunnen blokkeren zoals de CD25 receptor op regulatoire T cellen (van Esch, 2010). De invloed die het blokkeren/verwijderen heeft op de allergische response kan inzicht geven in de rol van de target in het tot stand komen van de allergische reactie of de bescherming daartegen. De aard van de depletie wordt bepaald aan de hand van resultaten uit het muismodel voor voedselallergie in combinatie met in vitro onderzoek met primair materiaal. Daarnaast zullen ook resultaten uit de transfer studie een basis vormen voor het depletie experiment (zie schema).
- **Donor studie:** Om mechanistische kennis te verkrijgen kunnen in vitro experimenten een goede aanvulling zijn. De werkzaamheid van voedingssupplementen kan bijvoorbeeld in vitro getest worden op primaire cellen zoals T cellen en dendritische cellen die worden gekweekt uit beenmerg cellen (Lutz, 1999) of uit de lymf organen (Smit, 2015) van donordieren die al dan niet allergisch zijn. Het in vitro onderzoek dient ter ondersteuning van de dierexperimenten en zal bijdragen aan kennis van het mechanisme van tolerantie inductie (zie schema).



Schouten B et al, Acute allergic skin reactions and intestinal contractility changes in mice orally sensitized against casein or whey. IAAI . 2008

Jo J et al, Role of cellular immunity in cow's milk allergy: pathogenesis, tolerance induction, and beyond. Mediators of Inflamm. 2014

Van den Elsen LWJ et al, CD25+ regulatory T cells transfer n-3 long chain polyunsaturated fatty acids-induced tolerance in mice allergic to cow's milk protein. Allergy. 2013

Schouten B et al, Oligosaccharide-induced whey-specific CD25(+) regulatory T-cells are involved in the suppression of cow milk allergy in mice. J Nutr. 2010

Van Esch BCAM et al, Oral tolerance induction by partially hydrolyzed whey protein in mice is associated with enhanced numbers of Foxp3+ regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes. PAI. 2011

Schouten B et al, Contribution of IgE and immunoglobulin free light chain in the allergic reaction to cow's milk proteins. J Allergy Clin Immunol. 2010

Murphy JT et al, Anaphylaxis caused by repetitive doses of a GITR agonist monoclonal antibody in mice. Blood. 2014

Kanjarawi R et al, Regulatory CD4+Foxp3+ T cells control the severity of anaphylaxis. PLoSOne. 2013

Trompette A et al, Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nature medicine. 2013

Van Esch BCAM et al, Depletion of CD4+CD25+ T cells switches the whey-allergic response from immunoglobulin E- to immunoglobulin free light chain-dependent. Clin Exp

Allergy. 2010

Lutz MB et al, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods. 1999

Smit JJ et al, Heterogeneous responses and cross reactivity between the major peanut allergens Ara h 1, 2,3 and 6 in a mouse model for peanut allergy. Clin Transl Allergy. 2015

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De beschreven onderdelen van de onderzoeksstrategie zijn essentieel voor de ontwikkeling van een effectieve therapeutische benadering met minder bijwerkingen voor voedselallergieën in diermodellen. Het eerste deel van de onderzoeksstrategie legt de nadruk op het aantonen van de effectiviteit van een specifieke behandeling en dient om vast te stellen welke aanpak significant effect heeft op de acute allergische response en/of tolerantie inductie en minder bijwerkingen heeft. Door verschillende combinaties te testen binnen het muismodel voor voedselallergie verwachten wij vast te kunnen stellen welke voedingssupplementen het best bijdragen aan het onderdrukken van de allergie en het induceren van tolerantie. Het aantonen van significante vermindering van de allergische response na challenge zien wij als een mijlpaal waarna wij zullen besluiten om onderzoek te verrichten naar het werkingsmechanisme van de geteste combinatie van immunotherapie en voedingssupplementen. Onderdeel 2 van de onderzoekstrategie volgt op onderdeel 1, zodat de werking van de therapeutische benadering meer in detail onderzocht kan worden (zie ook schematische weergave van de typen dierexperiment). Inzicht in specifieke veranderingen die optreden op cel-, eiwit- en DNA niveau levert wetenschappelijke kennis op die in de toekomst een bijdrage zou kunnen leveren aan vervolgonderzoek en aan het testen van de strategie in een klinische studie.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodel voor voedselallergie
2	Transfer studie
3	Depletie studie
4	Donor studie
5	
6	
7	
8	
9	
10	