

VERTROUWELIJK



**JAARVERSLAG
DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE
SANQUIN**

2003

Secretaris DEC Sanquin

Index

Onderwerp:	bladzijde:
1. Algemeen	3
2. Samenstelling DEC-commissie	4
3. Aantal vergaderingen	4
4. Toetsing dierexperimenteel onderzoek	5
5. Knelpunten	15

1. Algemeen

De DEC van Sanquin is erkend door de minister van VWS per 11 augustus 1997. De DEC adviseert alleen de eigen vergunninghouder, te weten de stichting Sanquin Bloedvoorziening.

Bij het toetsen van aangemeld onderzoek werd de procedure gevolgd die de afgelopen jaren ontwikkeld werd. Projecten met standaard proefdieronderzoek lopen meestal over meerdere jaren. Om een goed inzicht te krijgen in de samenhang tussen verschillende dierproeven moeten deze per project aangemeld worden. De geldigheidstermijn van standaardonderzoek is 4 jaar. De geldigheidstermijn voor overig onderzoek wordt per project bekeken. De maximale termijn waarvoor toestemming verleend kan worden is eveneens 4 jaar.

De DEC-protocollen kunnen eventueel door de Kleine Commissie worden beoordeeld mits het ongerief niet hoger is dan code 3 (matig) of hetzelfde onderzoeksplan reeds bij eerdere aanmelding door de voltallige DEC van een positief advies is voorzien. De Kleine Commissie komt niet als zodanig bij elkaar. Het protocol wordt rondgestuurd en elk lid van deze commissie plaatst zijn opmerkingen betreffende het onderzoek op het aanmeldingsformulier. Indien het toch wenselijk is om met elkaar te discussiëren, wordt op ad hoc basis een afspraak gemaakt. Gedurende het verslagjaar werd er één protocol door de kleine commissie beoordeeld.

DEC-protocollen betreffende een pilotstudie behoeven alleen de goedkeuring van het Hoofd PDH. Voor een pilotstudie gelden een aantal beperkingen die door de DEC zijn vastgesteld. De inschatting van het ongerief mag maximaal 3 (matig) zijn. Tevens mag het onderzoek voor de aangegeven vraagstelling slechts 1 keer uitgevoerd worden, de tijdsduur van het onderzoek mag niet langer zijn dan 3 maanden en het aantal dieren is beperkt tot 20. De DEC ontvangt de eerstvolgende vergadering het protocol ter kennisgeving. Gedurende het verslagjaar werden er geen pilotstudies aangevraagd en dus beoordeeld.

Alle aanmeldingen die niet aan bovenstaande criteria voldoen worden door de voltallige DEC beoordeeld, waarna advies aan de vergunninghouder gegeven wordt.

Indien de DEC-Sanquin dit wenselijk acht, wordt de artikel-9 functionaris uitgenodigd om nadere uitleg te geven tijdens de DEC-vergadering bij de bespreking van het desbetreffende project. Dit heeft ook bij herhaling plaatsgevonden.

2. Samenstelling DEC-commissie

De samenstelling van de DEC is erkend in 2001 en is gedurende het verslagjaar ongewijzigd gebleven.

<i>Leden</i>	<i>Dienstverband met de vergunninghouder</i>	<i>Betrokken bij dierproeven</i>	<i>Deskundigheid op het gebied van:</i>
1. Voorzitter	Nee	Nee	Ethische toetsing
2. Vice-voorzitter	Ja	Ja	Alternatieven
3. Secretaris	Ja	Ja	Proefdieren en alternatieven
4. Lid	Nee	Nee	Proefdieren
5. Lid	Nee	Nee	Dierproeven
6. Lid	Ja	Nee	Proefdieren.
7. Lid	Ja	Ja	Dierproeven.
Toehoorder: art-14 functionaris i.o. *	Ja	Nee	nvt

* met ondersteuning van de proefdierdeskundige NKI

Tevens is er een kleine commissie bestaande uit de vice-voorzitter, de secretaris en de artikel 14 functionaris.

3. Aantal vergaderingen

De Dierexperimentencommissie hield in 2003 vijf plenaire bijeenkomsten waarin meldingen voor proefdieronderzoek getoetst werden. Daarnaast werd problematiek van uiteenlopende aard betreffende proefdieronderzoek, relevante regelgeving en welzijnsaspecten besproken.

4. Toetsing dierexperimenteel onderzoek

De volgende protocollen werden tijdens het verslagjaar beoordeeld:

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
2002.031	<i>Titel: Investigating the role of the chemo-attractant receptor CXCR-4 bone marrow homing and engraftment.</i> Inhoud: Het doel van dit onderzoek is het bestuderen van de rol van de chemo-attractant receptor CXCR-4 in de homingsefficiëntie met behulp van een muizenmodel dat xenogene transplantatie toelaat (NOD-SCID). Hierbij zal de rol van CXCR-4 in homing in verschillende organen worden bestudeerd. Daarnaast zal de rol van CXCR-4 in de daadwerkelijke repopulatie van het beenmerg door bloedvormende cellen worden onderzocht. Een verbeterd inzicht in de rol van de specifieke receptor zou kunnen leiden tot het op therapeutische basis verbeteren van de homingsefficiëntie in stamcellen. Opmerking Art. 14 functionaris: Bij de statistische argumentatie (par. 4.5) wordt aangegeven dat in een voorgaand onderzoek bij 1 groep van 5 dieren 100% sterfte werd geconstateerd. De onderzoeker heeft daarom besloten de grootte van de groep te verhogen van 5 naar 10 dieren. Aangezien 100% sterfte werd aangetoond is de verwachting van onder meer de art. 14 functionaris dat op basis van statistische overwegingen een verdubbeling van het aantal dieren geen lager percentage sterfte verwacht mag worden. Antwoord onderzoeker: De sterfte in het voorgaand onderzoek betrof slechts 1 groep en lag geheel niet in de lijn van de verwachtingen. Op dit moment is het niet duidelijk wat het probleem heeft veroorzaakt. Er zijn 3 factoren mogelijk, namelijk de bestraling van de dieren, een reactie op de receptor of mogelijk toeval. Omdat in een eerder experiment, waar uitsluitend de stralingsdosis werd bepaald, ook 100% sterfte in een groep van 3 dieren is geconstateerd, terwijl in groepen welke waren blootgesteld aan een hogere dosis geen sterfte was, bestaat de mogelijkheid van toeval wel degelijk en ziet de onderzoeker toch voordeel in het inzetten van grotere groepen. Adviezen DEC aan onderzoeksgroep: Misschien is het verstandig om als eerste te beginnen met de controlegroep om te onderzoeken of er repopulatie van de cellen plaatsvindt. Ondanks bovengenoemde argumentatie van de onderzoeker kan er toch overwogen worden om eerst 5 muizen per groep te gebruiken. Afhankelijk van de resultaten kan dan eventueel een tweede experiment ingezet worden. Vanwege de complexiteit van het geheel en het feit dat de expertise vooral bij de onderzoeksgroep ligt, ziet de DEC de gegeven adviezen als vrijblijvend en laat aanpassing van het protocol op de besproken punten aan de onderzoeksgroep over. <i>Geldigheidstermijn: 1 jaar</i> <i>Aantal dieren: 78 muizen</i> <i>Inschatting ongerief: 18 dieren van de kortdurende proef ongerief 2 (gering/matig) door de bestraling en de fixatie bij de intraveneuze injectie; bij 60 dieren ongerief 4 (matig/ernstig) vanwege de te verwachten stralingsziekte als gevolg van de bestraling</i> <i>Doel proef: 37 (andere wetenschappelijke vraag).</i> Advies DEC: Positief advies

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
2002.032	<i>Titel: Factor VIII and von Willebrand Factor gene transfer by nonviral vector delivery to endothelial cell in vivo.</i> Inhoud: Het ontwikkelen van nieuwe strategieën voor de directe in vivo delivery van non-virale vectoren die coderen voor FVIII en het richten van deze systemen naar cellen die in staat zijn zowel FVIII als zijn fysiologisch "drager" von Willebrand Factor te produceren. Toelichting onderzoeker: De complexen van DNA en de delivery systemen worden intra veneus toegediend. Er bestaat een mogelijkheid dat de complexen van DNA en synthetische carriers toxisch zijn voor de muis. Afhankelijk van de hoeveelheden DNA en synthetische carrier (en met name 1 type carrier) kan eventueel ook longembolie optreden. Opmerking DEC: Door de mogelijkheid van longembolie en geringe toxiciteit van het complex, is het ingeschatte ongerief (3 = matig) voor het totale onderzoek aan de lage kant. De DEC stelt voor om de proef in paragraaf 4.1 op te delen in verschillende experimenten met als enig verschil het ingeschatte ongerief te baseren op de eventueel te verwachten complicaties. Dit zal door de secretaris worden aangepast in het DEC-protocol. <i>Geldigheidstermijn: 2 jaar</i> <i>Aantal dieren: 189 muizen</i> <i>Inschatting ongerief 3 (matig) voor 126 muizen en 4 (matig/ernstig) voor 63 muizen door de mogelijke complicaties voortkomend uit het te injecteren materiaal</i> <i>Doel proef: 33 (wetenschappelijke vraag mbt andere ziekten bij de mens)</i> Advies DEC: Positief advies
2003.001	<i>Titel: Opwekken van polyclonale antistoffen tegen humane PLSCR mbv synthetische peptiden.</i> Inhoud: In dit onderzoek wordt gekeken of het mogelijk is om met behulp van synthetische peptiden antistoffen op te wekken die gericht zijn tegen verschillende iso-vormen van humaan PLSCR (phospholipid scramblase). Hierbij zal de rol van PLSCR bij de veroudering van RBC (rode bloedcellen) worden onderzocht. Het nader karakteriseren van het te onderzoeken eiwit (mbv antistoffen) zou van belang kunnen zijn voor de verbetering van bewaarcondities voor RBC en de verdere ontwikkeling van virusinactivatie van RBC concentraten. Opmerking DEC: In het protocol wordt het doel van het experiment erg summier beschreven. Ondanks dat de DEC zich wel in staat voelt om een verantwoorde ethische afweging te maken op basis van de gegeven informatie, wil de DEC aan de onderzoeker toch een uitgebreidere schriftelijke toelichting vragen voor wat betreft het doel van het onderzoek. Deze toelichting zal in de eerstvolgende DEC-vergadering worden besproken. <i>Geldigheidstermijn: 1 jaar</i> <i>Aantal dieren: 6 konijnen</i> <i>Inschatting ongerief: 3 (matig) door het bijkomen uit de narcose bij de bloedafname.</i> <i>Doel proef: 37 (andere wetenschappelijke vraag met betrekking tot de mens).</i> Advies DEC: Positief advies onder voorwaarde: de onderzoeker dient een schriftelijke toelichting te geven waarbij het doel uitgebreider beschreven wordt. Toelichting onderzoeker: In de toelichting wordt door de onderzoeker uitgebreider ingegaan op het doel van het onderzoek. Het onderzoek beoogt meer inzicht te geven in het mechanisme van de activatie van phospholipide scramblase. Bij studies naar het effect van photodynamic treatment (PDT) op rode bloedcellen (voor bacterie en virusinactivatie) is een nieuw activatie mechanisme van scramblase gevonden. Dit mechanisme is onafhankelijk van de veranderingen van Ca²⁺ wat de enige activator is van scramblase tot nu toe.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
vervolg 2003.001	Uit eerder onderzoek is gebleken dat een aantal inhibitors in staat zijn om scramblase activatie van rode bloedcellen tegen te gaan. Om meer inzicht in het mechanisme te verkrijgen is het noodzakelijk om scramblase activiteit van rode bloedcellen snel te isoleren. Als methode is gekozen voor immunoprecipitatie. Aangezien niet bekend is welk scramblase-eiwit bij dit mechanisme is betrokken, zullen antistoffen tegen 3 of 4 bekende scramblases worden geproduceerd waarbij gebruik wordt gemaakt van synthetische peptiden welke gekoppeld worden aan KLH. De antistoffen zullen de onderzoeksgroep in staat stellen om te bepalen welke scramblase betrokken is bij de veranderingen die gezien zijn bij de rode bloedcellen of de scramblase veranderd tijdens de activatie en welke andere eiwitten inwerken op scramblase. Deze antistoffen zijn commercieel niet verkrijgbaar. De DEC vindt de toelichting inzichtelijk en adequaat.
2003.002	<i>Titel: Preventie van de ontwikkeling van remmende antistoffen tegen Factor VIII met behulp van orale tolerantie.</i> Inhoud: Het doel van het onderzoek is om methoden op te zetten waarmee orale tolerantie tegen factor VIII geïnduceerd kan worden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de β_2-adrenerge receptor agonist salbutamol. In deze studie zal worden onderzocht of orale toediening van salbutamol en factor VIII de vorming van remmende antistoffen tegen intraveneus toegediend factor VIII kan verminderen of zelfs voorkomen. De uitkomst van dit onderzoek geeft informatie met betrekking tot de mogelijkheid om orale tolerantie te induceren tegen bloedstollingsfactor VIII. Toelichting onderzoeker: Dit onderzoek kan gezien worden als een pilot waarbij gebruik gemaakt wordt van C57BL/6 muizen. Indien de resultaten bevredigend zijn, wil de onderzoeksgroep de orale toediening van salbutamol en factor VIII toepassen bij vervolgonderzoek. Hierbij zal gebruik worden gemaakt van factor VIII-KO muizen. Het betreft hier een bestaand diermodel met name is toegepast bij het onderzoek naar artritis. Opmerking DEC: Onder 4.8 staat dat bij onverwachte, ernstige ziekteverschijnselen de dieren worden opgeofferd na verdoving. De DEC wil dat de wijze van het doden van de dieren wat duidelijker omschreven wordt. Antwoord onderzoeker: Indien mogelijk zullen de dieren verbloed worden waarna halswervel dislocatie zal worden toegepast. Dit zal door de secretaris worden aangepast in het DEC-protocol. Geldigheidstermijn: 1 jaar Aantal dieren: 21 muizen Inschatting ongerief 3 (matig) door bijkomen uit narcose bij bloedafname. Doel proef: 33 (wetenschappelijke vraag mbt andere ziekten bij de mens) Advies DEC: Positief advies na aanpassing van het protocol.
2003.003	<i>Titel: Productie van antilichamen gericht tegen cellulair prion-eiwit en surrogaat markers voor transmissible spongiform encephalopathies (prion ziektes).</i> Inhoud: Het doel van het onderzoek is het vervaardigen van antilichamen gericht tegen cellulair prion eiwit en surrogaatmarkers voor het ontwikkelen van diagnostische test van prionziektes. Tevens zullen de antilichamen gebruikt worden als hulpmiddel om onderzoek te verrichten naar de pathogenese van prionziektes. De dieren zullen worden geïmmuniseerd met recombinant of gezuiverd prion eiwit en/of een surrogaat marker. Opmerking DEC: De DEC wil specifiekere informatie ontvangen ten aanzien welke recombinant of gezuiverd prion eiwit of surrogaat marker gebruikt zal worden voor de immunisatie. De aanvraag is gedaan voor 4 jaar omdat het een immunisatie betreft wat onder standaard onderzoek valt. Aangezien dit nieuw onderzoek is heeft de DEC besloten om de duur van de proef van 4 jaar naar 2 jaar terug te brengen. Dit zal schriftelijk aan de onderzoeker worden gemeld.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.003	<i>Geldigheidstermijn: aangepast van 4 naar 2 jaar</i> <i>Aantal dieren: 3 konijnen en 5 muizen</i> <i>Inschatting ongerief: 4 (matig/ernstig) door het gebruik van compleet Freund's Adjuvant.</i> <i>Doel proef: 33 (andere wetenschappelijke vraag met betrekking tot andere ziekte bij de mens).</i> Advies DEC: Positief advies voor een geldigheidstermijn van 2 jaar onder voorwaarde; de onderzoeker dient een schriftelijke toelichting te geven waarbij aangegeven wordt welke eiwitten en/of surrogaatmarkers gebruikt zullen worden voor de immunisaties. Toelichting onderzoeker: In de toelichting wordt door de onderzoeker uitgebreider ingegaan op de surrogaat markers die gebruikt zullen worden voor de immunisatie. Het betreft de surrogaatmarker erythroid differentiation-related factor (EDRF). In de literatuur wordt vermeld dat deze marker geschikt is als surrogaatmarker voor prion-ziektes. EDRF is een eiwit dat voorkomt in rode bloedcellen. Het eiwit stabiliseert vrije α-hemoglobine. Bij prion ziektes is het level van EDRF transcript verlaagd. De onderzoeker wil graag onderzoeken of dit op eiwit niveau ook zo is. Voor dit onderzoek zijn antilichamen tegen EDRF nodig. De DEC vindt de toelichting inzichtelijk en adequaat
2003.004	<i>Titel: Establishment of detection method for human platelets in the peripheral blood (and organs) of NOD/SCID mice in the perspective of an ex vivo expansion protocol of megakaryocytes.</i> <i>Inhoud: Het directe doel van het onderzoek is een detectiemethode te ontwikkelen voor humane plaatjes in perifeer bloed (en organen) van de NOD/SCID muis in het kader van een ex vivo expansieprotocol van megakaryocyten.</i> Toelichting onderzoeker: Dit onderzoek zal, zoals beschreven in het DEC-protocol, naast een klinische trial plaatsvinden waarbij een aantal Non Hodgkin Lymphoom patiënten worden getransplanteerd met geëxpandeerde megakaryocyten samen met een omgemanipuleerd stamceltransplantaat. Omdat het niet mogelijk is om bij de patiënten de homing en engraftment van geëxpandeerde cellen in de verschillende organen te kunnen bestuderen is het oorzakelijk om gebruik te gebruiken van een diermodel. Hierbij zullen de dieren worden bestraald met een sub-letale dosis waarna het transplantaat middels een intraveneuze injectie worden toegediend. In twee groepen zal tevens een intra peritoneale injectie met recombinant TPO toegediend worden om de rijping van de stamcellen extra te stimuleren. Opmerking DEC: Het ingeschatte ongerief is 3, in het recente verleden is echter gebleken dat bij soortgelijke experimenten er een groot aantal dieren ernstig ziek werd en dat tevens in het DEC-protocol al rekening wordt gehouden met 10% sterfte. Het daadwerkelijke ongerief van de dieren in het voorgaande onderzoek was 5 (ernstig). De DEC beslist om het ingeschatte ongerief te verhogen van 3 naar 5. Toelichting onderzoeker: Helaas is het niet gelukt om te achterhalen wat de oorzaak is van het hoge ongerief bij eerder uitgevoerde experimenten. Tevens is er in het voorgaande onderzoek gebleken dat de sterfte tussen de 10-30% lag in plaats van de verwachte 10%. Er zijn veel factoren die de verschijnselen die de dieren hebben kunnen verklaren. Er heeft een bespreking plaatsgevonden met het PDH betreffende de problemen. Navraag bij andere instellingen die soortgelijke experimenten uitvoeren is hetzelfde probleem geconstateerd. Het lijkt erop dat de dieren een verlate stralingsziekte krijgen. De verhoging van het ingeschatte ongerief naar 5 (ernstig) is inderdaad een reële inschatting.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.004	Advies DEC: De DEC stelt aan de onderzoeker voor om het aantal dieren te verhogen waardoor men ondanks de hogere sterfte van 30% in plaats van de 10% die aangeven wordt in het DEC-protocol het verhoogde ongerief voldoende resultaten zal krijgen. De DEC geeft ethisch gezien hier de voorkeur aan dan dat het onderzoek herhaald moet worden waardoor in totaal meer dieren gebruikt zullen moeten worden. Ook moet het sterftepercentage van de dieren in het DEC-protocol worden aangepast. Antwoord onderzoeker: Het verhogen van het aantal dieren zal inderdaad de kans op bruikbare resultaten vergroten. De groepsgrootte zal van 4 naar 6 verhoogd worden. Het DEC protocol zal dienovereenkomstig worden aangepast. <i>Geldigheidstermijn: 1 jaar</i> <i>Aantal dieren: 48 ipv 32 muizen;</i> <i>Inschatting ongerief: aangepast van 3 (matig) naar 5 (ernstig) door stralingsziekte.</i> <i>Doel proef: 37 (andere wetenschappelijke vraag).</i> Advies DEC: Positief advies na aanpassing van protocol betreffende de volgende punten: Het ongerief wordt verhoogd van 3 naar 5 en het aantal dieren wordt 48 in plaats van 32. Het vermelde sterftepercentage wordt 10-30% in plaats van 10%.
2003.005	Titel: <i>Weefsel-specifieke expressie van factor VIII.</i> Inhoud: Dit onderzoek is bedoeld om inzicht te verkrijgen in de biosynthetische capaciteit van diverse factor VIII-producerende organen en celtypen die daarvoor verantwoordelijk zijn. Dit onderzoek zal leiden tot een beter begrip van de moleculaire achtergronden van hetzij verlaagde (hemofilie A, ziekte van von Willebrand), hetzij verhoogde factor VIII spiegels (trombofilie). Tevens zal dit onderzoek aanknopingspunten kunnen bieden voor weefsel-specifieke gentherapie bij hemofilie A. Opmerkingen DEC: Dit betreft een lopend protocol waarbij in de afgelopen 2 jaar een heel klein aantal dieren is gebruikt (max. 15 dieren van de 170 aangevraagde dieren). Omdat dit een heel groot verschil is en in de DEC-aanvragen een reëel beeld gegeven moet worden van het aantal dieren dat men denkt te gebruiken, is voor de DEC-vergadering contact opgenomen met de onderzoeker met de vraag of in deze aangevraagde periode het relatief hoge aantal aangevraagde dieren gebruikt zal worden. Hierbij heeft de onderzoeker laten weten dat de verwachting is dat begin 2004 gestart zal worden met de experimenten en het beoogde gebruik reëel is. De DEC zal in de toekomst gericht aandacht geven aan dit punt. In het protocol geeft de onderzoeker bij de proefopzet aan dat de dosering van de ontstekingsopwekkers relatief laag zal zijn. Echter, wordt hierbij geen verwachting van de ontstekingsreactie aangegeven. De DEC kan hierdoor geen goede inschatting maken van het te verwachte ongerief. Aan de onderzoeker zal gevraagd worden naar de exacte dosering, alsmede de motivering voor deze keuze. Tevens wordt in dezelfde paragraaf aangegeven dat op verschillende tijdstippen tussen de 0 – 24 uur bloed zal worden afgenomen. Na maximaal 24 uur zullen de dieren worden verbloed en worden er organen uitgenomen. Er zullen 10 muizen per tijdstip per conditie worden gebruikt. De DEC vindt het beschreven bloedafnameregime te summier en kan de belasting van de dieren niet goed inschatten zonder aanvullende informatie. Als laatste had de DEC nog de volgende opmerking: In het DEC-protocol wordt aangegeven dat er 3 verschillende stammen zullen worden gebruikt per experiment. De DEC zou graag meer inzicht willen verkrijgen in de achterliggende reden om 3 verschillende stammen te gebruiken. Mocht de reden zijn dat zodoende meer genetische heterogeniteit wordt ingebracht, dan adviseert de DEC om een outbred stam te gebruiken.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.005	Omdat de DEC aan de hand van het ingediende DEC-protocol geen goede inschatting kan maken van de ethische toelaatbaarheid van de aanvraagde experimenten, is de nadere besluitvorming opgeschort tot aanvullende informatie van de onderzoeker is verkregen naar aanleiding van de opmerkingen van de DEC. Dit zal schriftelijk aan de onderzoeker worden medegedeeld. <i>Geldigheidstermijn: 2 jaar.</i> <i>Aantal dieren: 170</i> <i>Inschatting ongerief: 1 (gering) bij 20 muizen die gebruikt worden voor het oogsten van organen. Dit vindt plaats na halswerveldislocatie, 4 (matig/ernstig) bij 150 muizen waarbij er ontstekingen worden geïnduceerd.</i> <i>Doel proef: 33 (wetenschappelijke vraag mbt andere ziekten bij de mens).</i> Advies DEC: Opgeschort in afwachting van nadere informatie van onderzoeker Toelichting onderzoeker: De onderzoeker heeft tussentijds DEC-protocol 2003.005 laten vervallen en vervangen door DEC-protocol 2003.009. Aangezien bepaalde aspecten uit het nieuwe protocol identiek zijn aan het oude heeft de DEC tevens de door de onderzoeker aanvullende informatie met betrekking tot DEC-protocol 2003.005 bij de beoordeling van protocol 2003.009 meegenomen.
2003.006	<i>Titel: Factor VIII and von Willebrand Factor gen transfer by nonviral vector delivery to endothelial cells in vivo.</i> Inhoud: Het ontwikkelen van nieuwe strategieën voor de directe in vivo delivery van non-virale vectoren die coderen voor FVIII en het richten van deze systemen naar cellen die in staat zijn zowel FVIII als zijn fysiologisch "drager" von Willebrand Factor te produceren. Tot nu toe zijn er verschillende DNA-delivery systemen gebruikt in diersystemen. Veel van deze virale vectoren zijn problematisch gebleken in het provoceren van een immuunrespons tegen virale sequenties. Dit is vooral van belang omdat FVIII expressie vaak transient is en levels van FVIII te laag zijn om therapeutische efficiëntie te bereiken. Succesvolle FVIII expressie is reeds bereikt in muizen. Hierbij werd gebruik gemaakt van een retrovirale gen transfer, maar veiligheidsaspecten beperken nog steeds de toediening van deze vectoren in mensen. In het huidige project wordt een nieuwe strategie ontwikkeld voor de directe in vivo delivery van non-virale vectoren die coderen voor FVIII en het richten van deze systemen naar cellen die in staat zijn zowel FVIII als zijn fysiologische drager van Willebrand Factor (VWF) te produceren. Opmerkingen DEC: - Uit het DEC-protocol blijkt dat de inschatting van het ongerief als matig tot ernstig (code 4) is opgegeven. Volgens de informatie van de DEC, laten eerdere experimenten echter een veel hogere mate van ongerief zien (code 5-6). De inschatting van het ongerief dient derhalve dienovereenkomstig door de onderzoeker te worden aangepast. - Mede door het hoge ongerief ziet de DEC gaarne een uitgebreidere motivatie tegemoet inzake het doel van het onderzoek.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.006	- Aangezien de DEC begrepen heeft dat er een verschil in ongerief bestaat tussen de verschillende carriers, zou de DEC graag een uitgebreide argumentatie ontvangen waarom de onderzoeker toch tot de keus gekomen is juist de carrier te gebruiken die het hoogste ongerief geeft. Mocht het gebruik van juist deze carrier essentieel zijn voor het onderzoek, zou de DEC hieraan de randvoorwaarde willen koppelen dat de onderzoeker, alvorens de aangegeven experimenten uit te doen laten voeren, onderzoek doet naar de mogelijkheid een lagere concentratie van deze carrier te gebruiken. Dit vooronderzoek dient dan tevens bij de DEC te worden aangevraagd middels uitbreiding van het bestaande DEC-protocol en de verkregen resultaten dienen tevens te worden teruggekoppeld naar de DEC. Omdat de DEC aan de hand van het ingediende DEC-protocol geen goede inschatting kan maken van de ethische toelaatbaarheid van de gevraagde experimenten, is de nadere besluitvorming opgeschort tot aanvullende informatie van de onderzoeker is verkregen naar aanleiding van de opmerkingen van de DEC. Tevens wil de DEC aan de onderzoeker vragen om tijdens de volgende vergadering beschikbaar te willen zijn om eventueel aanvullende informatie te verschaffen indien de DEC dit noodzakelijk acht. Dit zal schriftelijk aan de onderzoeker worden meegedeeld. <i>Geldigheidstermijn: 2 jaar</i> <i>Aantal dieren: 135 muizen</i> <i>Inschatting ongerief: 4 (matig/ernstig) vanwege mogelijke toxiciteit van het te injecteren materiaal.</i> <i>Doel proef: 33 (andere wetenschappelijke vraag met betrekking tot andere ziekte bij de mens).</i> Advies DEC: Opgeschort in afwachting van nadere informatie van onderzoeker De onderzoeker heeft het DEC-protocol naar aanleiding van de opmerkingen van de DEC aangepast en was aanwezig tijdens de DEC-vergadering om een mondelinge toelichting te geven. Toelichting onderzoeker: Aangezien in een ander instituut bij het toedienen van deze carrier geen problemen in deze mate zijn geconstateerd, is er in overleg met het PDH nog een kleine pilot opgezet waarbij de doseringen met een factor 10 verlaagd waren. Helaas bleek ook bij deze doseringen acute toxiciteit op te treden. Derhalve is besloten om de carrier pDMEAMA vanwege het hoge ongerief van de dieren niet meer te gebruiken. Om een goede keuze te kunnen maken tussen de twee overgebleven carriers wordt zoals vermeld in het DEC-protocol, eerst de effectiviteit van deze carriers onderzocht en zal het vervolgonderzoek plaatsvinden met de meest effectieve carrier. Vraag DEC: Is er een verklaring waarom in het andere instituut geen problemen zijn geconstateerd zoals bijvoorbeeld het gebruik van een andere muizenstam? Antwoord onderzoeker: Ze gebruiken in het betreffende instituut inderdaad een andere muizenstam. Tevens is gebleken dat tussen verschillende batches van pDEAMA grote verschillen zijn gevonden betreffende de toxiciteit en de daarmee samenhangende effectiviteit van de carrier. Aanpassingen protocol: Bij eerder onderzoek waarbij de toxiciteit van de 3 verschillende carriers is onderzocht, is gebleken dat bij 1 carrier (pDMEAMA) toxiciteitsproblemen bij de dieren werd geconstateerd. Dit resulteerde in een ongerief van 5-6. Vanwege deze problemen zal verder worden afgezien van het gebruik van deze carrier. Bij de andere twee carriers (DOTAP en IPEI) werden geen problemen bij de dieren waargenomen. Voordat de experimenten beschreven in het ingediende protocol worden uitgevoerd, zal de effectiviteit van de twee carriers worden onderzocht. De meest effectieve, niet toxische carrier zal in het vervolgonderzoek worden gebruikt. In deze studie wordt de tijdsafhankelijkheid van de expressie op mRNA niveau nader

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.006	bestudeerd. De verwachting is dat de mRNA expressie na verloop van tijd zal afnemen door silencing van de promotor in het DNA construct en door eventuele ontwikkeling van antistoffen tegen humaan VWF of FVIII eiwit. In het kader van eventuele therapeutische vooruitzichten voor de ziekte hemofilie A is het van belang te weten hoe transient de expressie van de toegediende constructen is en hoe lang mRNA expressie aangetoond kan worden. Door de aanpassing van de proefopzet is het aantal aangevraagde dieren van 135 aanzienlijk kleiner geworden en zijn nu maar 50 dieren aangevraagd. <i>Geldigheidstermijn: 2 jaar</i> <i>Aantal dieren: 50 muizen</i> <i>Inschatting ongerief: 4 (matig/ernstig) vanwege mogelijke toxiciteit van het te injecteren materiaal</i> <i>Doel proef: 33 (andere wetenschappelijke vraag met betrekking tot andere ziekte bij de mens).</i> Advies DEC: Positief advies
2003.007	<i>Titel: Productie van immuunreagentia voor diagnostisch bloedonderzoek bij mensen.</i> <i>Inhoud: Het bereiden van antisera die gericht zijn tegen diverse humane serumeiwitten en celspecifieke antigenen. Afnemen en/of totaal bloed/serum worden opgewerkt in laboratoria tot specifieke reagentia voor wereldwijd gebruik in de diagnostiek. Naast het belang van goede reagentia ten behoeve van laboratoriumdiagnostiek kan tevens voor wetenschappelijke doeleinden de correlatie tussen afwijkende eiwitpatronen in plasma en bepaalde ziektebeelden worden gelegd.</i> Opmerkingen DEC: Bij het bespreken van het voorgaand DEC-protocol met betrekking tot dit onderzoek werd er aangegeven dat men bezig is met het ontwikkelen van alternatieven. Is de status hiervan bekend? Toelichting onderzoeker: Het onderzoek naar alternatieven is nog in volle gang, maar hebben helaas nog geen concrete resultaten opgeleverd. Het onderzoek naar alternatieven blijft een hoge prioriteit van de onderzoeksgroep, niet alleen om ethische overwegingen maar ook omdat de productie van deze reagentia in proefdieren zeer kostbaar is. Ook wordt nog steeds onderzoek gedaan naar verfijning van de proefopzet met het doel om het overal proefdiergebruik te verminderen. <i>Geldigheidstermijn: 1 jaar</i> <i>Aantal dieren: 250 schapen en 20 konijnen</i> <i>Inschatting ongerief: 4 (matig/ernstig) door het gebruik van FCA als adjuvant.</i> <i>Doel proef: 01 (Onderzoek m.b.t. de mens ontwikkelen sera/ vaccins/biologische producten).</i> Advies DEC: Positief advies.
2003.008	<i>Titel: Mechanisme doorbreken tolerantie in een diemodel voor milde hemofilie A.</i> <i>Inhoud: De vorming van antistoffen gericht tegen factor VIII is een belangrijke complicatie bij de behandeling van patiënten met de bloederziekte hemofilie A. Hierdoor is de behandeling niet meer effectief en gaat dit gepaard met ernstige bloedingcomplicaties. Bij voorgaand onderzoek waarbij gebruik werd gemaakt van een transgene muis welke een humane variant van factor VIII met 1 enkele aminozuursubstitutie tot expressie brengt, is gebleken dat subcutane toediening van factor VIII in de aanwezigheid van een sterk adjuvant aanleiding geeft tot de vorming van antistoffen. Tot nu toe zijn slechts een beperkte serie experimenten uitgevoerd. De resultaten van het voorgaand onderzoek wijzen erop dat de doorbraak van tolerantie afhankelijk is van het aantal toedieningen van factor VIII.</i>

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.008	In dit onderzoek zal na subcutane toediening op verschillende tijdstippen dieren worden opgeofferd en zal de samenstelling van T en B cel compartimenten in kaart worden gebracht. Opmerkingen DEC: Ondanks dat het volgens de vigerende richtlijnen toegestaan is om 300 µl bloed af te nemen bij de muis, is de DEC van mening dat dit hoge volume door de aanvrager gerechtvaardigd dient te worden of dat bijstelling naar een lagere hoeveelheid dient plaats te vinden. Antwoorden onderzoeker: De onderzoeker geeft aan dat een lager volume ook voldoende materiaal moet kunnen bieden om het laboratoriumonderzoek te kunnen uitvoeren. Afsproken wordt om het volume per dier op 200 µl te stellen. De bloedafnames zullen uitsluitend worden gedaan bij de niet transgene dieren, omdat bij de transgene dieren de verwachting is dat deze de handeling niet goed zullen doorstaan (vanwege beperkte stollingscapaciteit). <i>Geldigheidstermijn: 2 jaar</i> <i>Aantal dieren 336 muizen.</i> <i>Inschatting ongerief: 3 (matig) bij 96 dieren door het bijkomen uit narcose na bloedafnames, 5 (ernstig) bij 240 door het gebruik van FCA als adjuvant.</i> <i>Doel proef: 33 (wetenschappelijke vraag mbt andere ziekten bij de mens).</i> Advies DEC: Positief advies.
2003.009	<i>Titel: Weefsel-specifieke expressie van factor VIII</i> Dit protocol is ter vervanging van het vervallen protocol 2003.005. Aangezien bepaalde aspecten uit dit protocol overeenkomen met protocol 2003.005 heeft de DEC de door de onderzoeker aanvullende informatie met betrekking tot DEC-protocol 2003.005 meegenomen bij de beoordeling van dit protocol. Inhoud: Dit onderzoek is bedoeld om inzicht te verkrijgen in de biosynthetische capaciteit van diverse factor VIII-producerende organen en celtypen die daarvoor verantwoordelijk zijn. Dit onderzoek zal leiden tot een beter begrip van de moleculaire achtergronden van hetzij verlaagde (hemofilie A, ziekte van von Willebrand), hetzij verhoogde factor VIII spiegels (trombofilie). Tevens zal dit onderzoek aanknopingspunten kunnen bieden voor weefsel-specifieke gentherapie bij hemofilie A. Opmerkingen DEC: - In de proefopzet worden bij de doseringen van alle ontstekingsopwekkers zeer ruime marges genomen. De DEC zou graag zien dat dit verder geconcretiseerd wordt in de relatie tot de voorgenomen doseringsstudie. De onderzoeker dient een exacte opgave te doen van de verschillende doseringen per type experiment - De DEC vraagt zich af waarom gekozen is om zo'n hoog aantal ontstekingsopwekkers te testen binnen één proefopzet en of het geen voordelen biedt om deze in een zekere volgorde te testen, waarbij het vinden van een effect door één van de geteste opwekkers verder onderzoek naar de andere opwekkers overbodig maakt. - In de proefopzet wordt aangegeven dat de injectieroutes intra-peritoneaal, subcutaan of intraveneus kunnen zijn. De DEC acht het essentieel voor de beoordeling dat de exacte route per type experiment wordt aangegeven. - In paragraaf 4.1 bij experiment 2 worden er 146 dieren aangevraagd. In de proefopzet (par. 3.2) wordt vermeld dat 130 muizen voor de experimenten zullen worden gebruikt. Vervolgens geeft de onderzoeker aan dat er per ontstekingsopwekkers 36 muizen zijn benodigd. Dit betekent een totaal van $4 \times 36 = 144$ dieren. Het is de DEC onduidelijk om welke aantallen muizen het hier nu precies gaat. De DEC acht inzicht in de juiste aantallen essentieel voor de beoordeling.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.009	Omdat de DEC, aan de hand van het ingediende DEC-protocol, geen goede inschatting kan maken van de ethische toelaatbaarheid van de gevraagde experimenten, is de nadere besluitvorming opgeschort tot aanvullende informatie van de onderzoeker is verkregen. Tevens wil de DEC aan de onderzoeker vragen om tijdens de volgende vergadering beschikbaar te willen zijn om eventuele aanvullende informatie te kunnen verstrekken. <i>Geldigheidstermijn: 2 jaar</i> <i>Aantal dieren 166 muizen.</i> <i>Inschatting ongerief: 1 (gering) bij 20 dieren bij het oogsten van organen, 4 (matig/ernstig) bij 146 muizen waarbij onstekingsreacties worden geïnduceerd.</i> <i>Doel proef: 33 (wetenschappelijke vraag mbt andere ziekten bij de mens).</i> <u>Advies DEC: Opgeschort in afwachting van nadere informatie van onderzoeker.</u> De onderzoeker heeft vervolgens het DEC-protocol laten vervallen met als reden dat de proeven het komende jaar niet zullen worden uitgevoerd.
2003.010	<i>Titel: Suppressie van immuunreactie tegen factor VIII en daarmee de suppressie van de ontwikkeling van antistoffen tegen factor VIII door middel van orale toediening van Salbutamol.</i> Inhoud: De vorming van antistoffen gericht tegen factor VIII is een belangrijke complicatie bij de behandeling van hemofilie A patiënten. Dit heeft tot gevolg dat de behandeling van deze patiënten met factor VIII concentraat niet meer effectief is. Hierdoor kunnen ernstige bloedingcomplicaties optreden. Deze patiënten worden op dit moment in het algemeen behandeld met geactiveerde stollingspreparaten. Deze methode is echter minder effectief in het voorkomen van bloedingen. In dit project wordt onderzocht of het mogelijk is om de ontwikkeling van antilichamen tegen factor VIII te voorkomen door middel van het toedienen van Salbutamol. De resultaten van een eerder uitgevoerd onderzoek laten zien dat het toedienen van Salbutamol na immunisaties met factor VIII de vorming van antistoffen tegen Factor VIII verminderd. In deze nieuwe aangevraagde studie zal onderzocht worden of de eerder gevonden resultaten gereproduceerd kunnen worden waarbij tevens getracht wordt om het effect te optimaliseren. De effecten van de behandeling met Salbutamol zal worden onderzocht in muizen met een verschillende genetische achtergrond, waaronder FVIII K.O. muizen. Dit om een completer beeld te krijgen van de mogelijke effecten bij patiënten van verschillende genetische achtergrond. Toelichting onderzoeker: Salbutamol is een β_2-adrenerge receptor agonist en door binding van Salbutamol aan de receptor wordt de intracellulaire concentratie van cAMP verhoogd. Hierdoor worden een groot aantal intracellulaire processen beïnvloed. Salbutamol remt de synthese van cytokines die in het algemeen betrokken zijn bij een ontsteking. Bij eerdere experimenten is onderzoek gedaan naar de effecten van orale toediening van Salbutamol met Factor VIII, uitsluitend Salbutamol en PBS. De resultaten van dit onderzoek geven aan dat toedienen van Salbutamol met Factor VIII een daling van de antistofvorming veroorzaakt ten opzichte van de controle groep. Bij de groep waarbij alleen Salbutamol werd toegediend was een nog groter daling te zien. Bij het aangevraagde onderzoek zal uitsluitend Salbutamol worden toegediend in het drinkwater. Zoals in het DEC-protocol aangegeven zullen naast twee eerder gebruikte muizenstammen tevens K.O. muizen worden gebruikt. Vraag DEC: Worden er eventuele gezondheidsproblemen bij de dieren verwacht door de onderdrukking van het immuunsysteem door de continue toediening van Salbutamol? Antwoord onderzoeker: Het effect van de Salbutamol op het immuunsysteem van de dieren is zeer mild. Men kan het vergelijken als een lichte mate van stress of lichamelijke activiteit. De verwachting is dat dit geen problemen geeft bij de gezondheid van de dieren.

Protocol nr.	Beschrijving protocol, advies DEC, eventuele vragen, opmerkingen en toelichtingen
Vervolg 2003.010	Opmerking DEC: De titel luidt: Suppressie van de immuunreactie tegen factor VIII en daarmee de ontwikkeling van remmende antistoffen tegen factor VIII door middel van orale toediening van Salbutamol. Voor de duidelijkheid is het beter om te spreken over de suppressie van de ontwikkeling van remmende antistoffen. Bij par. 4.8 wordt gevraagd op welke indicatie de proefdieren voortijdig worden gedood. Er wordt vermeld dat dit bij onverwachte ernstige ziekteverschijnselen zal plaatsvinden. De DEC zal dit graag aangepast willen zien in ernstige ziekteverschijnselen omdat zij van mening zijn dat bij alle ernstige ziekteverschijnselen altijd ingegrepen moet worden en niet alleen bij onverwachte ziekteverschijnselen. Deze opmerkingen zullen worden aangepast in het protocol. Opmerking art. 14 functionaris: Bij de vraag wie of welke instantie de wetenschappelijke kwaliteit heeft beoordeeld staat aangegeven dat dit Sanquin Research is. Wat wordt hiermee bedoeld? Antwoord onderzoeker: Het betreft een intern project en is goedgekeurd door het Management Team van Sanquin Research. Dit MT bestaat uit alle afdelingshoofden van Sanquin Research. <i>Geldigheidstermijn: 1 jaar</i> <i>Aantal dieren: 42 muizen.</i> <i>Inschatting ongerief: 3 (matig) door bijkomen uit narcose bij de bloedafname.</i> <i>Doel proef: 33 (wetenschappelijke vraag mbt. Andere ziekten bij de mens).</i> Advies DEC: <u>Positief advies na aanpassing van het DEC-protocol</u>
2003.011	<i>Titel: Determination of the detection level of human cells in mouse blood.</i> <i>Inhoud:</i> Ten ondersteuning van reeds door de DEC goedgekeurd onderzoek (bv. DEC-protocol 2003.004), is het noodzakelijk om het detectieniveau van humane cellen in muizenbloed te bepalen. Om deze reden zijn een tiental dieren aangevraagd die op het moment dat er bloed nodig is, verbloed zullen worden. <i>Geldigheidstermijn: 1 jaar</i> <i>Aantal dieren: 10 muizen</i> <i>Inschatting ongerief: 1 (gering) door het niet meer bijkomen uit de narcose tbv van een verbloeding.</i> <i>Doel proef: 37 (andere wetenschappelijke vraag).</i> Advies DEC: <u>Gelet op de code ongerief is dit DEC-protocol al door de kleine commissie goedgekeurd. De DEC had geen opmerkingen.</u>

5. Knelpunten

Er zijn tijdens het verslagjaar geen knelpunten geconstateerd die het goed functioneren van de DEC hebben gehinderd. Het overleg met de betreffende artikel 9 functionarissen was zeer goed te noemen en nagenoeg alle adviezen gericht op inhoudelijke aanpassing van protocollen waren overgenomen.