

Datum ontvangst DEC: 8-3-2005

DEC nr: 1854

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient uiterlijk 7 werkdagen voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

E-mail:

telefoon:

/ fax:

Instituut:

ALGEMEEN

1. Titel van het onderzoeksplan:

Juveniel Neurotoxiciteit: Onderzoek naar adequate gedragsparameters voor ratten (pups, speenlingen en jong volwassenen) ten behoeve van het opsporen van effecten van perinatale blootstelling aan neurotoxische stoffen (methylkwik, methylazoxymethanol)

Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

Overgewicht en gerelateerde risico's: predispositie door maternaal overgewicht

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr:

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD):

C.S.:

Externe samenwerking (indien van toepassing):

Radboud Universiteit Nijmegen ()

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: (Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail:)

Start expositie: Medio april 2005. Exacte datum wordt nog doorgegeven.

Geplande duur van de onderzoeksplan:

in-life fase: circa 10 weken (inclusief blootstellingsperiode en het testen van gedrag)

Locatie waar dieren worden gehouden:

4. Codenummers volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MAM (2.5 mg/kg)	1	2	1	10 ♂ + 10 ♀	37	2	7	5	1	1	1		1
MAM (5 mg/kg)	1	2	1	10 ♂ + 10 ♀	37	2	7	5	1	1	1		1
MeHg (0,75 mg/kg)	1	2	1	10 ♂ + 10 ♀	37	2	7	5	1	1	1		1
MeHg (1,5 mg/kg)	1	2	1	10 ♂ + 10 ♀	37	2	7	5	1	1	1		1
Controle	1	2	1	10 ♂ + 10 ♀	37	2	7	5	1	1	1		1

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden ?

- Wat is een optimaal doseringsschema voor het testen van effecten van neurotoxische stoffen als methyalkwik, methylazoxymethanol bij ratten kort na de geboorte?
- Welke gedragstesten en gedragsparameters zijn bij ratten adequaat om effecten van neurotoxische stoffen op het nog in ontwikkeling zijnde zenuwstelsel te kunnen sporen bij ratten, beginnend kort na de geboorte tot aan volwassenheid (d.w.z. ratten pups, ratten speenlingen en (jong) volwassen dieren)?
- In welke verhouding staat de gevoeligheid van de non-invasieve gedragstesten t.o.v. het macroscopisch/microscopisch onderzoek aan de hersenen na afloop van de studie, daar waar het gaat om het aantonen van effecten van neurotoxische stoffen op de (vroege) ontwikkeling van het zenuwstelsel?

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier:

Stoffen als kwik hebben een negatief effect op het zenuwstelsel, maar met name het nog in ontwikkeling zijnde zenuwstelsel is buitengewoon gevoelig voor de toxiciteit van kwik en bepaalde andere neurotoxicanten. Er bestaan reeds verscheidene methoden voor het testen van chemicaliën, pharmaca en voedingsstoffen op neurotoxische effecten in volwassenen en volwassen dieren. Steeds vaker blijkt echter dat gegevens uit studies met volwassenen en/of volwassen dieren echter niet zonder meer geëxtrapoleerd kunnen worden, op basis van lichaamsgewicht, naar baby's en jonge kinderen of jonge dieren. In deze studie worden diverse gedragstesten, die eerder gevalideerd werden voor volwassen ratten, opgezet voor het screenen van toxische effecten op het zich ontwikkelende zenuwstelsel bij jonge ratten. Het beoogde belang voor de maatschappij is het bevorderen van voorspellingen omtrent neurotoxische effecten van chemicaliën, pharmaca en voedingsstoffen in baby's en jonge kinderen. Daarbij wordt juveniele toxicologie steeds meer een 'hot item'.

6.a.2 Economisch belang:

... n.v.t

6.a.3 Milieu belang:

... n.v.t

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3:

... Deze studie is een voorstudie in het kader van de obesitas hoofdstudie.

6.b Wetenschappelijk belang:

n.v.t.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld? Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Zo nee, waarom niet?

Deze studie is een voorstudie waarin bestaande testmethoden voor volwassen ratten, worden getoetst op bruikbaarheid voor pups.. Methoden, die effectief blijken in de voorstudie, worden later in de hoofdstudie 'obesitas' toegepast.

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn)?

- nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DEC-advies nr.:
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren: OECD 424 en EPA OPPTS 870.6200
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen? (Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz. Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaard-protocol voor de nadere uitwerking.)

De dieren worden bij TNO in Zeist gehuisvest.

40 ratten worden vanaf dag 1 na de geboorte tot en met dag 4 subcutaan blootgesteld aan 2.5 of 5 mg/kg methyloxymethanol (2 maals daags). 40 andere ratten worden vanaf dag 1 tot en met dag 21 (tot aan 'weaning') subcutaan blootgesteld aan 0.75 of 1,5 mg/kg methylnitrosamine (1 maals daags).

De effecten van deze perinatale blootstelling zullen worden bestudeerd middels verscheidene gedragstesten, waarmee specifieke domeinen van het zenuwstelsel bestudeerd kunnen worden. Een korte samenvatting van de verschillende testen vlogt hieronder.

Spontane locomotore activiteit wordt gemeten met behulp van een videocamera en een video image analysis system (Ethovision). Verschillende aspecten van de vroege locomotore ontwikkeling worden bestudeerd, zoals de totale loopafstand, het verloop van de loopafstand over de tijd (eventueel habituatie) en het aantal oprichtingen. Spontane motorische activiteit wordt gemeten gedurende 30 minuten. Ratten worden in zgn. open 'open field bakken' geplaatst, waarin ze vrij kunnen bewegen (PN 13, 17, 21, 60-62). De motor activiteit wordt uitgevoerd op dag 13, 17, 21 en 60 (+/- 2) na de geboorte, zoals dat wordt voorgesteld in richtlijn voor 'developmental neurotoxicity screening'.

De Functional observational battery (FOB) omvat een serie non-invasieve gedragsobservaties en interactieve metingen, die samen een beeld geven van de functionele integriteit van het proefdier. De FOB bevat observaties in de thuiskooi en in een open veld situatie, testen van reflexen, het meten van grijpkracht en het bepalen van lichaamsgewicht en lichaamstemperatuur (rectaal). Deze testen worden uitgevoerd na de speentijd (PN 21) en op PN 60. De FOB wordt bij elk dier steeds zoveel mogelijk op dezelfde tijd van de dag uitgevoerd.

Ook zullen verschillende fysische en sensorische 'landmarks' gemeten worden, zoals omkeerreflex, haargroei en het openen van de ogen. Deze zijn kenmerkend voor het vaststellen van bepaalde fasen van ontwikkeling.

Andere gedragstesten die uitgevoerd dienen te worden zijn de startle, passive and active avoidance, the T-maze en looppatroon.

De startle is een 'arousal' test, waarbij men de ratten een kort en hard geluid laten horen. De reactie wordt hierbij geregistreerd. Deze test wordt uitgevoerd aansluitend aan de FOB testen.

De passive avoidance is een test om de cognitie (leer-en geheugen) van de ratten te testen. Hierbij wordt de ratten geleerd om geen respons te geven wanneer een bekend signaal (zoals het aangaan van een lamp) gegeven wordt die een stimulus presenteert. Deze test zal plaats vinden rond 'weaning'.

Met het testen van het gedrag wordt er rekening mee gehouden dat de dieren niet te zwaar worden belast.

Bij de active avoidance (ook een cognitietest) wekt men een vermijdingsreactie bij een rat op die erop gericht is na een bekend signaal (bijvoorbeeld het aangaan van een lamp) een onaangename stimulus (bijvoorbeeld een klein schokje of een 'windvlaag') te ontwijken. Deze test wordt op dag 60 gedaan.

De T-maze is ook een gedragstest waarbij men de leer/geheugen-taak voor jonge ratten kan testen. Deze test wordt op dag 22 uitgevoerd.

Met het bestuderen van het looppatroon worden delen van het neuromusculaire domein en van het activiteit domein getest. Daartoe worden poten van ratten met een daartoe geschikt product bestreken waarna ze zich tussen twee wandjes voortbewegen over een strook papier.

Naast de gedragstesten worden de dieren dagelijks geobserveerd en eventuele klinische verschijnselen worden genoteerd. Tevens worden de dieren tijdens de proef minimaal wekelijks gewogen. Voerverbruik wordt wekelijks per kooi gemeten om de gemiddelde blootstelling te kunnen bepalen.

Na afloop van de gedragstesten (PN 60) worden de dieren opgeofferd. Bij deze dieren vindt pathologisch onderzoek plaats.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL ♂	AANTAL ♀
A	Control	Zie punt 9 deze aanvraag	10	10
B	2.5 mg/kg MAM	Idem	10	10
C	5 mg/kg MAM	Idem	10	10
D	0.75 mg/kg MeHg	Idem	10	10
E	1,5 mg/kg MeHg	Idem	10	10

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard protocol:

(Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd.

Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandeling deze dieren eventueel ondergaan.)

In totaal zullen 15 zwangere vrouwen worden besteld. Zodat 50 mannelijke en 50 vrouwelijke rattenpups in de studie kunnen worden gebruikt. Het aantal van 10 dieren/sex/groep is gewenst om een zinvolle (statistische) analyse van de resultaten mogelijk te maken. Genoemde aantallen dieren zijn de minimum aantallen zoals genoemd in de draft OECD 426 richtlijn, EPA 870.6300 en EPA 870.8600 richtlijnen. In de richtlijnen wordt geadviseerd voor bepaalde gedragtests aparte subgroepen in te zetten, zodat de verschillende tests niet met elkaar interfereren wat betreft het aangeleerde gedrag in de verschillende tests.

Om het aantal dieren in deze studie te minimaliseren worden in deze studie geen aparte subsets gebruikt, maar passeren de controle dieren in dezelfde volgorde de verschillende tests, zodat vergelijking van behandelde dieren met de controledieren gerechtvaardigd is. Per groep worden 10 dieren/sex gebruikt, omdat dit aantal wel het minimum is voor statistische analyse van de resultaten.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, en welke ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe: (N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8).

In deze studies worden mannelijke en vrouwelijke ratten van de stam Wistar Crl:[WI]WU BR gebruikt. De rat is gekozen omdat dit een geschikte diersoort is die wordt gevraagd door de regelgevende instanties en in de richtlijnen genoemd wordt als een geschikte species. De genoemde stam is een algemeen gebruikte stam voor toxicologisch/farmacologisch fundamenteel onderzoek in dit laboratorium.

Welke sexe wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Beide geslachten worden gebruikt. De ontwikkeling van het zenuwstelsel is bij de beide geslachten verschillend. O.m. als gevolg daarvan is de gevoeligheid van mannetjes en vrouwtjes voor de toxische werking van een stof verschillend.

De effectieve testmethoden uit deze voorstudie worden later ook toegepast in studies die volgens de richtlijnen voor 'Developmental Neurotoxicity testing' worden uitgevoerd.

13. Wat is de herkomst van de dieren?

- ☒ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☐ overcomplete dieren
- ☒ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef?

- ☒ euthanasie :Als anestheticum zal een ether-roesje gebruikt worden; ether wordt voor neuropathologisch onderzoek verkozen boven andere anaesthetica daar van ether bekend is dat het geen instantane veranderingen veroorzaakt aan de synaps (de prikkeloverdrachtplaatsen tussen de zenuwcellen) wat bijvoorbeeld barbituraten wel doen. Uiteraard wordt ethernarcose toegediend via inhalatie van etherdamp vermengd met lucht ("borrelpot").
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:-

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd? (Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.)

Alle dieren worden onder standaard laboratorium condities gehuisvest gedurende de gehele studie, en zullen standaard knaagdiervoer en leidingwater krijgen (*ad libitum*). De aangekochte gedekte (zwangere) dieren zullen tijdens zwangerschap en lactatie individueel worden gehuisvest. Na spenen zullen de nakomelingen 5 per kooi worden gehuisvest in macrolon bakken met corncop bedding. Op de dagen dat de gedragstesten uitgevoerd worden, worden dieren tijdelijk individueel gehuisvest in macrolon bakken van minimaal 1 uur voor aanvang van de test tot na afloop van de gedragstesten.

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief: (Geef hierbij, gespecificeerd per handeling of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.)

Bij de gekozen concentratie van 2.5 of 5 mg/kg MAM en 0.75 of 1.5 mg/kg MeHg worden geen of slechts geringe neurotoxische effecten verwacht. De gedragstesten veroorzaken gering/matig ongerief.

17. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):.

Wegen, merken, doden met CO ₂ (tussentijds zieke dieren)	ongerief: gering
Subcutane toediening teststoffen 4 of 20 dagen	ongerief: gering
Gedragstesten (herhaald)	ongerief: gering/matig

Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief		Duur van het ongerief			
		< 1 dag	1-7 dagen	7-30 dagen	> 30 dagen
Mate van ongerief	A: gering	Euthanasie Merken	Subcutaan toedienen	Subcutaan toedienen Wegen	
	B: gering/matig		Gedragstesten		
	C: matig				
	D: matig/ernstig				

(Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.)

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? (Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.)

De aard van de gedrags-experimenten staat geen ingrepen zoals bovengenoemd toe tijdens de in-life fase van de proef.

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Bij ernstige systemische toxiciteit of neurotoxiciteit, of bij ander ernstig ongerief, worden dieren direct uit de studie genomen en opgeofferd (CO₂ euthanasie)

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop? (Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.)

Er zijn geen bijkomende risico's te verwachten.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel in vivo als in vitro, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Gedragsonderzoek en neuropathologisch onderzoek aan het intacte zenuwstelsel kan alleen 'in vivo' worden uitgevoerd. Het aantal dieren is het minimale voor een zinvolle statistische benadering.

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

nvt.

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan?

- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
- ☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel. [REDACTED])
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. [REDACTED])
- ☐ elders, n.l.:
- zo nee; waarom niet: zie punt 21.

ANDERE ASPEKTEN

Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang? *.(Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.)*

23. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

Onderzoeker:

Management

datum:

datum:

Na behandeling:
secretaris DEC