

Datum ontvangst DEC:

14-2-2006

DEC nr: 2080

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

[redacted]

[redacted]

E-mail: [redacted]

telefoon: [redacted] / fax: [redacted]

Instituut: [redacted]

ALGEMEEN

- Titel van het onderzoeksplan:** In vivo micronucleus test in rat epidermal skin cells
Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing): Pilot en eerste deel van EZ-co project ('06-'08): 'Ontwikkeling en prevalidatie van een huid fotogenotoxiciteit test'
- Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):** [redacted]
E-mail adres onderzoeker: [redacted]
Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: [redacted]
Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [redacted] (12), [redacted]
Externe samenwerking (indien van toepassing): n.v.t.
- Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:** week 10 (studie 1) en maart-sept 2006 (studie 2 -4)
(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail: [redacted])
Geplande duur van het onderzoeksplan: 1-2 weken
Locatie waar dieren worden gehouden: [redacted]

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

groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Studie 1													
A	1	02	1	5	03	1	1	08	01	4	1	1	1
B	1	02	1	10	03	1	1	08	01	4	1	2	1
C	1	02	1	5	03	1	1	08	01	4	1	3	1
Studie 2													
A	1	02	1	20	03	1	1	08	01	4	1	2	1
Studie 3													
A	1	02	1	10	03	1	1	08	01	4	1	1	1
B	1	02	1	10	03	1	1	08	01	4	1	2	1
C	1	02	1	5	03	1	1	08	01	4	1	3	1
Studie 4													
A	1	02	1	10	03	1	1	08	01	4	1	2	1
B	1	02	1	20	03	1	1	08	01	4	1	3	1
Reserve	1	02	1	10	03	1	1	08	01	4	1	3	1

RELEVANTIE

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

In de gentox is het gebruikelijk de potentie van een stof om genetische schade te induceren, eerst te bestuderen in vitro. Echter als in de in vitro testen een genotoxische response wordt waargenomen, wordt er een in vivo test geëist. Op het gebied van de photogenotoxiciteit (genetische schade geïnduceerd door stoffen die geactiveerd worden door UV licht) bestond er geen in vivo test. Recentelijk heeft TNO een model ontwikkeld die het mogelijk maakt micronuclei (MN) te scoren in de huid van ratten. De methode lijkt veel belovend en zal in samenwerking met een Pharmaceutisch bedrijf verder ontwikkeld worden om te kijken of het model voorspellend is voor de detectie van photocarcinogenen (EZ-Co project). Deze aanvraag beschrijft een pilot studie en de ontwikkelingsfase, daarna zal er (indien succesvol gebleken) een testfase worden uitgevoerd komen waarin stoffen uit een bepaalde klasse getest worden om de voorspellende waarde en de gevoeligheid van het model vast te stellen. Het uiteindelijke doel is om voldoende inzicht en data te generen zodat het model in aanmerking kan komen voor een internationale validatie die moet leiden tot een OECD richtlijn.

In deze eerste fase zullen 4 studies worden uitgevoerd die de volgende vragen moeten beantwoorden:

- 1) Pilot: De farmaceutische industrie (EU+VS) gebruikt meestal Sprague Dawley in toxiciteit en kinetiek studies en heeft een sterke voorkeur voor het gebruik van deze stam. In de eerste studie zal bestudeerd worden of deze stam geschikt is. Criteria zijn UV-gevoeligheid en isolatie van epidermale cellen. Er wordt gezocht naar de UV-dosis die een kleine inductie (2x achtergrond) van hoeveelheid DNA schade geeft.

Indien succesvol, zal verder gegaan worden met studie 2-4. Indien niet, zal een andere strain/species worden overwogen.

- 2) Wat is de optimale tijd voor Micronuclei (MN) expressie? Optimum ligt naar verwachting ergens tussen 48-120h, om ook kleine verschillen in MN inductie te kunnen detecteren moet de maximale MN inductie tijd worden vastgesteld.

Er zal ook een kinetiek studie uitgevoerd worden met 8-MOP op te kunnen bepalen wanneer de concentratie 8-MOP in bloed en huid na toediening het hoogst is. Voor dit kinetiek onderdeel zal een aparte DEC aanvraag worden gedaan. Deze kinetiek studie vindt plaats voor de uitvoering van studies 3 en 4.

- 3) Wat is de optimale orale dosis 8-MOP? Tot nu toe is 8-methoxypsoralen als positieve controle gebruikt na dermale toediening. Echter voor validiteit van de orale route, moet 8-MOP als pos controle via orale route ook aangetoond worden. Hiervoor zal gebruik gemaakt worden van gegevens uit studie 1 en 2 en de kinetiek studie.

- 4) Hoe is de reproduceerbaarheid en hoe groot is variabiliteit bij combinatie van optimale UV en 8-MOP dosis? Om dit te bepalen zal de optimale conditie 2 keer herhaald worden.

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

Ter voorkoming van ongewenste blootstelling van personen aan carcinogene en/of mutagene stoffen die geactiveerd worden door UV licht, moeten o.a. de mogelijke photomutagene/carcinogene eigenschappen van de stof worden onderzocht (Photosafety testing). Deze informatie moet verkregen worden m.b.v. betrouwbare methoden. Dit type onderzoek kan er toe bedragen dat er een betere inschatting gemaakt kan worden van de mogelijke risico's voor de mens.

6.a.2 Economisch belang

Indien deze methode goed voorspelbaar is voor de photocarcinogeniteit zal het deze methode het aantal kostbare carcinogeniteit studies kunnen verminderen en de 'time-to-market' voor nieuwe medicijnen kunnen reduceren.

6.a.3 Milieu belang

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

6.b Wetenschappelijk belang:

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?

De opzet van dit project is uitgebreid besproken met de co-financier. Ook zal de EZ-co commissie het project beoordelen. De opzet is grotendeels vergelijkbaar met de in-vivo micronucleus test in beenmergcellen. Deze methode is vastgelegd in een Internationale Richtlijn studie (OECD, EU, FDA) en als zodanig is de wetenschappelijke kwaliteit van het onderzoeksplan beoordeeld. Tevens zijn deskundigen op het gebied van huideffecten en UV betrokken bij dit onderzoek.

PROEFOPZET

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

- X nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan, maar sluit aan bij DEC 1592, 1713, 1791, 1966
- O herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DEC-advies nr.:
- O proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
- O proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- X anders, n.l.: verkrijgen van expertise voor het uitvoeren van een in vivo photo MN test in de huid

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 standaardprotocol voor de nadere uitwerking.

Voor alle dieren geldt dat de rug huid van de dieren wordt geschoren minimaal 1 uur voor behandeling.

Gedurende de UV blootstelling zitten de dieren (max 3) in marclon bak en kunnen vrij rondlopen.

Alle dieren worden opgeofferd dmv decapitatie na CO₂/O₂ verdooving. Direct na offeren wordt de huid verwijderd voor verdere opwerking (isolatie van epidermale cellen).

Alle groepen bestaan uit 5 dieren

Studie 1

Groep 1: geen UV (neg. controle)

Groep 2: 1 MED (minimal erythema dose) UV (± 15 min)

Groep 3: 2 MED (minimal erythema dose) UV (± 30 min)

Groep 4: 3 MED (minimal erythema dose) UV (± 45 min)

Dieren worden 72h na blootstelling geofferd

Studie 2

Groep 1: 8-MOP dermaal*, - UV (neg. controle) offeren 72h na doseren

Groep 2: 8-MOP dermaal, + UV ** offeren 72h na doseren

Groep 3: 8-MOP dermaal, + UV ** offeren 96h na doseren

Groep 4: 8-MOP dermaal, + UV ** offeren 120h na doseren

Dieren worden 30 min na blootstelling bestraald

* Dermale 8-MOP dosis is 60 µg/ml, 15 µl/cm², huidoppervlakte 12 cm² (zoals gebruikt in vorige studies)

** De UV dosis uit studie 1 die een ongeveer 2x verhoging van achtergrond schade geeft wordt gekozen voor studie 2

Na studie 2 zal er een kinetiek studie plaats vinden met 8-MOP. Uit deze studie moeten gegevens komen die de volgende vragen beantwoorden: op welk tijdstip na doseren moeten de dieren bestraald worden? Wat is de T_{max} en C_{max} in bloed en huid na orale en dermale blootstelling?

Studie 3

Groep 1: vehicle, - UV (blanco)

Groep 2: vehicle, + UV (neg. controle)

Groep 3: 8-MOP oraal (low dose) *, + UV **

Groep 4: 8-MOP oraal (mid dose), + UV **

Groep 5: 8-MOP oraal (high dose), + UV **

De optimale opofferingstijd wordt bepaald uit studie 2

* Orale doseringen worden gekozen obv kinetiek studie, vehicle is maisolie of methylcellulose (1%), dosing volume 10 ml/kg-bw

** De UV dosis uit studie 1 die een ongeveer 2x verhoging van achtergrond schade geeft wordt gekozen voor studie 3

Studie 4

Groep 1: vehicle, - UV (blanco)

Groep 2: vehicle, + UV** (neg. controle)

Groep 3: 8-MOP oraal *, + UV

De optimale opofferingstijd wordt bepaald uit studie 2

* Orale dosering wordt gekozen obv resultaten studie 3

** De UV dosis uit studie 1 die een ongeveer 2x verhoging van achtergrond schade geeft wordt gekozen voor studie 3

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

Studie 1

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A	Geen behandeling	Rughuid scheren Opofferen dmv decaputatie	5	Males
B	1 MED UV	Rughuid scheren UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
C	2 MED UV	Rughuid scheren UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
D	3 MED UV	Rughuid scheren UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males

Studie 2

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A	8-MOP, zonder UV	Rughuid scheren	5	Males

		Dermaal doseren Opofferen dmv decaputatie		
B	8-MOP, met UV, offeren 72h	Rughuid scheren Dermaal doseren UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
C	8-MOP, met UV, offeren 96h	Rughuid scheren Dermaal doseren UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
D	8-MOP, met UV, offeren 120h	Rughuid scheren Dermaal doseren UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males

Studie 3

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A	Vehicle, zonder UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2X) Opofferen dmv decaputatie	5	Males
B	Vehicle, met UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x) UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
C	8-MOP (low dose), met UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x) UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
D	8-MOP (mid dose), met UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x) UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
E	8-MOP (high dose), met UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x) UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males

Studie 4

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A	Vehicle, zonder UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x) Opofferen dmv decaputatie	5	Males
B	Vehicle, met UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x) UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie	5	Males
C	8-MOP, met UV	Rughuid scheren Oraal doseren (2x)	5	Males

		UV blootstelling Opofferen dmv decaputatie		
--	--	---	--	--

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.

Op basis van resultaten tot nu toe verkregen met andere ratten stam is 5 dieren/groep voldoende om effecten te kunnen meten. Bovendien volgens de richtlijnen van MN test in beenmerg (en andere in vivo gentox testen) zijn 5 analyseerbare dieren per groep nodig om een significant verschil te kunnen meten. Omdat we van deze stam nog niet weten hoe groot de variatie is en of de isolatie net zo efficiënt is, en om uitval (door verkeerd doseren) te compenseren worden er 10 reserve dieren gevraagd (ong. 10%).

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, en welk ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Welke sexe 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.

Sprague Dawley. Mannetjes worden gebruikt omdat er geen sexe verschillen te verwachten zijn. Twee sexen bij de ontwikkeling van een model betekent dat er 2 keer zoveel dieren nodig zijn. Evt kan in een latere fase bestudeerd worden of er wel of geen verschillen in sexe zijn.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

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

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- X euthanasie
- O gebruik voor een volgende proef
- O andere vergunninghouder
- O 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 het dier.

In macrolon kooien met metalen ruif en een bedding van houtschaafsel. De dieren worden gehuisvest maximaal 5 per kooi. Voedsel en water ad libitum. De lucht in de kamer wordt ongeveer 10 keer per uur verversed en op een temperatuur van 22 +/- 3°C gehouden met een relatieve vochtigheid van 30-70%. Verlichting is artificieel met 12 uur geel licht en 12 uur donker.

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.

Rughuid scheren	ingeschat als gering ongerief
Dosering 1-malig dermaal met 8-MOP	ingeschat als gering/matig ongerief
Dosering vehicle 2x oraal	ingeschat als gering ongerief
Dosering 8-MOP 2x oraal (low en mid dose)	ingeschat als gering/matig ongerief
Dosering 8-MOP 2x oraal (high dose)	ingeschat als matig ongerief
UV blootstelling (1 en 2 MED)	ingeschat als gering/matig ongerief
UV blootstelling (3 MED)	ingeschat als matig ongerief
Opofferen (decapitatie)	ingeschat als gering ongerief

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

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		30		
	B: gering/matig		55		
	C: matig		10		
	D: matig/ernstig				
	E: ernstig				
	F: zeer 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.

Er wordt geen ernstig ongerief verwacht. De doseringen 8-MOP (oraal) worden gebaseerd op de nog uit te voeren kinetiek studie. De dermale dosis 8-MOP is bekend uit voorafgaande studies. De hoeveel UV licht tot 2 MED zal hoogstwaarschijnlijk geen effecten hebben; bij 3 MED kan er mogelijk wat roodheid op de huid worden waargenomen..

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

Dieren met ernstige huidafwijking (erythem) en/of zieke dieren worden uit de proef genomen.

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 worden geen bijkomende risico's verwacht (zie 18).

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:

Binnen de gentox en ook de photogentox wordt er eerst in vitro getest. Echter voor de risico evaluatie is het van belang om te weten of deze effecten ook in vivo worden waargenomen. Alleen indien er effecten worden waargenomen wordt er in een tweede stap in vivo getest. Op dit moment is er geen short term in vivo photogentotoxiciteit test. De enige mogelijkheid is een langdurige photocarcinogeniteit test, die gepaard gaat met veel proefdieren en veel ongerief. Indien deze methode succesvol wordt zal het het aantal photocarcinogeniteits testen kunnen reduceren.

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

N.V.T.

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

X TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]

O Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel [REDACTED])

O Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

O elders, n.l.:

O zo nee; waarom niet:

ANDERE ASPEKTEN

23. 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.

Geen.

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

N.V.T.

Onderzoeker

Afdelingshoofd
Physiological Sciences

Datum:

Datum:

Na behandeling:
secretaris DEC