

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

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

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

[REDACTED]

[REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

telefoon: [REDACTED] / fax: [REDACTED]

Kerngebied en locatie: [REDACTED]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: A subacute immunotoxicity study in Göttingen Minipigs® upon exposure to the classical immunosuppressive compounds Cyclosporin A or Dexamethasone.

1.2. studienummer: 8047

1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):
KIP project van het VP ILS: Enabling techn. ILS-Pharma

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [REDACTED]

E-mail adres onderzoeker: [REDACTED]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [REDACTED]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [REDACTED]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

In dit KIP project wordt samengewerkt met Ellegaard (leverancier mini-pigs)

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 18 juli (eerste bloedafname 17 juli) 2008

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

[REDACTED])

Geplande duur van het onderzoeksplan: 41 dagen (einde studie 27 augustus 2008)

Locatie waar dieren worden gehouden: [REDACTED]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-3	1	42	2	24	37	1	1	5	12	1	1	3	1

RELEVANTIE

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

De immunologische eindpunten die we hebben geïmplementeerd in de pilot studie zoals beschreven in DEC 2470 zullen worden gemeten in minipigs die wel of niet behandeld zijn met een bekende immuunsuppresserende stof. We willen onderzoeken of het mogelijk is, met de ontwikkelde technieken, immuunsuppressie te kunnen aantonen. Dus naast het meten van **kwantitatieve** immuun(toxicologische) eindpunten (b.v. hematologie + lymfocyten subset analyses, wegen en histopathologie van diverse lymfoïde organen/weefsels) willen we ook **kwalitatieve** immuun(toxicologische) eindpunten [b.v. functionele immunologische eindpunten zoals de humorale- (antilichaam productie) en cellulaire (DTH-reactie)- immunologische responsen tegen een T cel afhankelijk antigeen meten als ook een parameter van de niet-specifieke immuunrespons (NK assay). Bovendien assays zijn in rodent-studies de meest toegepaste immuuntoxicologische eindpunten .

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
- 6.a.2 Economisch belang
- 6.a.3 Milieu belang
- 6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

Stoffen die nieuw op de markt worden gebracht moeten getest worden op toxiciteit in zowel een knaagdier als een niet-knaagdier species. Er is nog weinig ervaring en ook nog weinig bekend in de open literatuur over immunotoxiciteitsstudies in niet-knaagdieren. Om in de toekomst stoffen te kunnen testen op potentiële immunotoxiciteit in niet knaagdieren is het ontwikkelen van immuuntoxicologische eindpunten in non-rodent species nodig. Als uit deze studie blijkt dat immuunsuppressie kan worden waargenomen met de door ons ontwikkelde technieken, is het in de toekomst mogelijk deze species te gebruiken voor het testen van potentiële immuuntoxiciteit van nieuwe stoffen (o.a. medicijnen)

6.b Wetenschappelijk belang:

Er zal getracht worden dit onderzoek in de wetenschappelijke literatuur te publiceren, zodat andere onderzoeksinstellingen onze ervaring met deze assays kunnen gebruiken voor het beantwoorden van hun specifieke vraagstellingen.

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 wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan is gestaafd aan de huidige stand van zaken met betrekking tot wetenschappelijke publicaties in dit veld en is getoetst door [REDACTED] (TNO [REDACTED]).

PROEFOPZET

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

- X nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- O herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- O proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
 - wettelijke eis:
 - testrichtlijn:
- O proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- O 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 standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

De studie wordt uitgevoerd met 3 groepen mannelijke en vrouwelijke minipigs. Elke groep bestaat uit 4 mannen en 4 vrouwen.

De dieren worden gedurende 39 dagen behandeld met vehicle (groep 1), cyclosporine A (groep 2) of dexamethasone (groep 3). De week voor de behandeling zullen we kijken hoe de proefstof toegediend kan worden. De voorkeur gaat uit naar toediening van de teststoffen in het voer. De week voor behandeling zullen we dit uittesten met een vergelijkbaar volume aan maisolie in het voer (de dieren kunnen zo ook wennen aan het voeder-regime). Indien de teststoffen op deze manier toegediend kunnen worden zullen wij deze methode hanteren. Indien de dieren de teststof niet willen eten zullen wij overgaan op toediening via een sonde (het zou dus kunnen zijn dat we de proef beginnen met toediening via het voer, maar dat gedurende het experiment overgegaan zal worden op toediening via een sonde). Toediening in het voer heeft onze voorkeur (minste ongerief).

De dieren worden op dag 14 en dag 28 intramusculair geïmmuniseerd met KLH [10 mg/200 µl injectie in het nekgebied (op aanraden van de leverancier van de minipigs)].

Bloedmonsters (maximaal 17 ml, via de vena cava cranialis) zullen worden afgenomen op de volgende dagnummers: -1, 13, 19, 21, 24, 27, 33, 35, 38. Uit de pilotstudie is gebleken dat de pieken van de primaire anti-KLH antilichaamrespons rond dag 7 na KLH-injectie ligt (daarom bloedmonsters op dag 19, 21 en 24), en dat de secundaire anti-KLH antilichaamrespons ongeveer 5 dagen (daarom bloedmonsters op dag 33, 35 en 38) na secundaire KLH injectie de antilichaamrespons begint te stijgen.

Op dag 31 krijgen de dieren twee intradermale injecties met KLH (2 concentraties in maximaal 50 µl PBS) en een intradermale injectie met PBS (maximaal 50 µl) in de flank (een stukje uit elkaar, zodat de afzonderlijke reacties waarneembaar zijn; totaal dus 3 intradermale injecties), waarna op dag 33 en 34 de DTH-respons wordt gemeten (score op roodheid en zwelling en diameter van de zwelling). Op dag 39 (mannen) en 40 (vrouwen) zullen de dieren worden opgeofferd en ter sectie worden aangeboden. Organen die gerelateerd zijn aan het immuunsysteem zullen worden verzameld (bijv. thymus, milt, diverse lymfeklieren, beenmerg).

Voor de volledige proefopzet zie onderstaand schema:

Dagnummer	Ingereep
-x	• Dieren wegen
-1	• Bloedafname (17 ml)
0	• Dieren wegen • Start toedienen proefstoffen (bij voorkeur via voer, indien niet mogelijk via sonde)
0-39	• Toedienen proefstoffen
13, 27	• Bloedafname (15 ml)
19, 21, 24, 33, 35, 38	• Bloedafname (2 ml)
14, 28	• KLH-injectie (i.m.)
31	• DTH (injectie max. 50 µl PBS en max 50 µl KLH intradermaal in de flank op 3 afzonderlijke plaatsen)
33	• DTH huidreactie meten
34	• DTH huidreactie meten
39/40	• Sectie (verdoving medetomidine en midazolam (voorverdoving) en sodium pentobarbital voor opoffering of soortgelijk middel en daarna verbloeden)

Verder zullen de dieren wekelijks gewogen worden. De dosis van de proefstoffen wordt gebaseerd op het laatst gemeten lichaamsgewicht.

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

Groep	Behandeling	Biotechnische handelingen	aantal	Sexe
1	Vehicle	Toediening proefstof (via voer of via sonde) Bloedafname (dag -1, 13, 19, 21, 24, 27, 33, 35, 38) i.m. injectie (d14, d28) wegen (dag -x, dag 0, daarna wekelijks tot en met sectiedag) i.d injectie (3 plaatsen; d31) DTH-respons aflezen Euthanasie/sectie (d39/40)	4/4	♂/♀
2	Cyclosporine A	Toediening proefstof (via voer of via sonde) Bloedafname (dag -1, 13, 19, 21, 24, 27, 33, 35, 38) i.m. injectie (d14, d28) wegen (dag -x, dag 0, daarna wekelijks tot en met sectiedag) i.d injectie (3 plaatsen; d31) DTH-respons aflezen Euthanasie/sectie (d39/40)	4/4	♂/♀
3	Dexamethasone	Toediening proefstof (via voer of via sonde) Bloedafname (dag -1, 13, 19, 21, 24, 27, 33, 35, 38) i.m. injectie (d14, d28) wegen (dag -x, dag 0, daarna wekelijks tot en met sectiedag) i.d injectie (3 plaatsen; d31) DTH-respons aflezen Euthanasie/sectie (d39/40)	4/4	♂/♀

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 studieplan:

Wij hebben gekozen om in deze studie zoals gebruikelijk is in vergelijkbare sub-acute toxiciteitsstudies met honden of niet-humane primaten (NHP) voor 4 dieren/sex/groep, dus in totaal 24 dieren. De spreiding in de resultaten verkregen met de verschillende immuun toxicologische eindpunten zullen uitwijzen of in de toekomst volstaan kan worden met dit aantal dieren/sex/groep of dat een hoger aantal zal moeten worden gebruikt.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

Er wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke minipigs. De keuze is gemaakt voor de minipig omdat de minipig in de toekomst meer zal worden gebruikt voor het testen van de veiligheid en effectiviteit van nieuwe (bio)pharmaceuticals (mogelijk kan de minipig in een aantal gevallen NHP vervangen) en het doel van de studie is om immunotoxicologische eindpunten te ontwikkelen in deze niet-knaagdier species. Beide sexen worden gevraagd door regulatorische instanties. In deze studie geeft het gebruik van beide species nog informatie over de verschillen die bestaan tussen mannelijke en vrouwelijke minipigs.

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 ten behoeve van de proef
- O euthanasie na afloop van de proef
- 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 de dieren.

De dieren worden per behandelgroep gehuisvest in 1 hok. Mannelijke en vrouwelijke dieren worden gescheiden gehuisvest. De hokken voldoen aan de Europese richtlijnen voor de huisvesting van proefdier-minipigs. Zij hebben hierbij de beschikking over stro en speelbal. De dieren krijgen 2 x daags een afgemete hoeveelheid voer, en water is ad libitum beschikbaar.

De dieren zullen dagelijks worden geobserveerd op klinische verschijnselen.

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.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1-3	24	Toediening proefstof Bloedafname i.m. injectie wegen i.d injectie DTH-respons aflezen Euthanasie/sectie 1x	1 x daags, 39 dagen 8 x 2 x 8 x 3x	1-3 3 2 1 Injectie: 2 Reactie op injectie: 2 1

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 4 Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandelresultaat.
Gebruik de codering:
Code 1: gering
Code 2: gering/matig
Code 3: matig
Code 4: matig/ernstig
Code 5: ernstig
Code 6: zeer ernstig
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- 6 Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-3	24	3

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Nauwkeurig bijhouden van klinische verschijnselen en ingrijpen bij ernstig ongerief

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

Complicaties worden niet voorzien. Echter, als de dieren meer dan matig/ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de behandelingen, dan zullen de dieren vroegtijdig worden gedood.

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.

De dieren in de groepen 2 en 3 worden behandeld met een immuunsuppressivum en deze dieren zijn dus gevoeliger voor infecties dan normaal. Echter, doordat de dieren niet in aanraking komen met andere dieren dan die in de studie, zal de kans op infecties niet erg groot zijn. Er worden bij deze doses van de proefstoffen geen ernstige bij-effecten verwacht. Van de injecties met KLH worden geen bij-effecten verwacht gezien ook bevindingen in de pilot studie.

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 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Deze proef is bedoeld om methoden te ontwikkelen om immunotoxiciteit van nieuwe stoffen te testen. Door de grote wisselwerking tussen vele verschillende celtypen van het afweersysteem is voor het testen van toxiciteit van nieuwe stoffen op het immuunsysteem een intact immuunsysteem noodzakelijk.

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

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

☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. ()

☐ Art. 14 functionaris (), tel ()

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

☐ elders, n.l.:

☒ zo nee; waarom niet: Het doel van de studie kan slechts worden bereikt met een intact immuunsysteem.

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.

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

DTH-respons: Een plaatselijke reactie van het afweersysteem gericht tegen een bepaald antigeen. Deze plaatselijke afweerreactie uit zich als een rood vlekje op de huid en de grootte van deze rode vlek is een maat voor de grootte van de T-cel afhankelijke afweerrespons.

KLH: Een eiwit-antigeen (Keyhole Limpet Hemocyanin) dat gebruikt wordt om afweer-responsen op te wekken.

onderzoeker

Management

datum:

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker.