

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:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Luchtwegallergie: inhalatoire LLNA (Local Lymph Node Assay) – Onderzoek naar de omstandigheden waaronder het vluchtige luchtwegallergeen glutaraaldehyde positief is in de inhalatoire LLNA

1.2. **studienummer:** 8222

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):**
KIP - sensibilisatie

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

E-mail adres onderzoeker: [Redacted] / [Redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [Redacted] / [Redacted]

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

Externe samenwerking (indien van toepassing): nvt

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 15 oktober 2008

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

[Redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 12 dagen

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [Redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1/2/3/4/5	1	01	2	30*	33	1	1	05	05	1	1	3	1
6/7	1	01	2	12*	33	1	1	05	07/08	1	1	2	1
8	1	01	2	6*	33	1	1	05	01	1	1	1	1

* plus 4 reservedieren (in totaal)

RELEVANTIE

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

In de door de OECD geaccepteerde Local Lymph Node Assay (LLNA) worden stoffen dermaal getest op zowel de mogelijkheid om sensibiliserend te zijn (potential) als de mate waarin ze dat zijn of bij welke dosis ze dat zijn (potency). Interessant is dat luchtwegallergenen ook positief zijn in de dermale LLNA. Op zich is dat niet vreemd omdat sensibilisatie in de lokale lymfeklier een lymfocytair reactie opwekt die voor zowel huid- als luchtwegallergenen gelijk is. Daar komt nog bij dat de bekende luchtwegallergenen ook huidallergie kunnen veroorzaken.

In een vorige studie (DEC aanvraag 1909 en 2206) werden huid- en luchtwegallergenen zowel dermaal als inhalatoir getest. Opmerkelijk genoeg waren alle allergenen positief via beide toedieningsroutes, alleen het vluchtige formaldehyde was negatief in de inhalatoire LLNA. Dat kan betekenen:

- formaldehyde kan niet sensibiliseren via de luchtwegen (het staat nu alleen bekend als huidallergeen). Dat is opvallend aangezien het bekende huidallergeen DNCB wel positief was.

of

- Vluchtige allergenen kunnen niet sensibiliseren via de luchtwegen omdat de lokale (i.e. in de respiratoire weefsels) concentratie te laag is. Er zijn mogelijk omstandigheden, waaronder niet getest wordt, maar die bij de werkplek mogelijk wel tot veel hogere lokale concentraties leidt, namelijk hoge luchtvochtigheid.

De industrie heeft veel belangstelling voor dit werk, en de resultaten van DEC 1909 en 2206 konden snel worden gepubliceerd in een tijdschrift met hoge impactfactor. Wel moet worden verklaard waarom juist een vluchtig allergeen, waaraan mensen met name inhalatoir zullen worden blootgesteld, het niet doet in de inhalatoire LLNA.

Het doel van de proef is om het vluchtige huid- en luchtwegallergeen glutaaraldehyde te testen in een inhalatoire LLNA, waarbij het allergeen als damp gegenereerd wordt bij een relatieve luchtvochtigheid (RV) van 50% (2 concentraties; lage concentratie per oppervlak) en door verneveling bij RV = 100% (2 concentraties; hoge concentratie per oppervlak). In geval van verneveling onder de laatstgenoemde omstandigheden zal de stof de luchtwegen dus als druppeltje bereiken (in tegenstelling tot een damp), wat leidt tot een hoge (locale) concentratie per oppervlakte-eenheid. Het experiment wordt uitgevoerd met glutaaraldehyde als teststof, omdat epidemiologisch onderzoek heeft aangetoond dat blootstelling in de praktijk kan leiden tot astmatische klachten. Glutaaraldehyde is, in tegenstelling tot formaldehyde, een erkend luchtwegallergeen. Bovendien maken de fysische eigenschappen van glutaaraldehyde het gemakkelijker - in vergelijking met formaldehyde - om de stof in waterdruppeltjes vast te houden waaruit het weinig verdampt, in het geval van dosering als aerosol.

De concentraties en blootstellingsduur zijn gebaseerd op eigen ervaring (DEC 1909 en 2206) en literatuur gegevens [1,5 uur blootstelling: J. Ezendam et al. 2007, RIVM report 340301001; 18 ppm ivm 4u LC50 (rat) van 23,5-44,3 ppm (Ballantyne & Myers, 2001); 6 ppm ivm RD50 (=maat voor irritatie: 50% afname van ademfrequentie; muis) van 13,9 ppm (Werley et al., 1995)]. Er is weinig bekend met betrekking tot het vermogen van glutaaraldehydedamp om te sensibiliseren via de luchtwegen. Glutaaraldehydedamp (13 ppm) in een studie met cavia's (Werley et al., 1995), was negatief. In het huidige experiment wordt er dus, in ieder geval bij de laagste concentratie, geen sensibilisatie verwacht door glutaaraldehydedamp.

Als positieve controle wordt glutaaraldehyde op de huid getest (huid LLNA) in 2 concentraties: 0,25% en 2,5% hetgeen respectievelijk zou moeten leiden tot een Th1 of Th2 respons [Azadi et al., 2004; EC3 (huid LLNA): 0,089% BALB/c muis (Azadi et al., 2004); 0,06% (Hilton et al., 1998; diersoort onbekend)].

De proef wordt zo uitgevoerd dat proliferatie van lymfocyten kan worden bepaald ex vivo (vermindering benodigd radioactief materiaal en dus ook afval, geen injectie van proefdieren met radioactief materiaal nodig) en tegelijkertijd de cytokine productie kan worden gemeten. Dit betekent dat meteen informatie over Th1 versus Th2 respons wordt verkregen [gangbare methode om allergenen onder te verdelen in huid- (Th1) en luchtwegallergenen (Th2)]. Op deze manier worden 2 testen ineen geschoven, wat leidt tot een belangrijke reductie in aantal proefdieren.

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

Op de werkplek worden zeer veel mensen blootgesteld aan stoffen die wel/niet immunologisch gemedieerde luchtwegreacties kunnen veroorzaken. Op dit moment zijn er geen gevalideerde (dier-) modellen die stoffen kunnen screenen op dergelijke eigenschappen. Deze studie vormt een onderdeel van de ontwikkeling van een proefdiermodel, maar wordt ook gebruikt om het gedrag van een vluchtige allergene stof te bepalen, wat gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van *ex vivo* en *in vitro* modellen.

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

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

Mensen die een beroepsallergie ontwikkelen kunnen daar jaren zeer veel last van hebben (ook nadat ze niet meer worden blootgesteld); beroepsallergie kan zelfs fataal zijn. Kosten die gemoeid zijn bij medicatie van beroepsastma zouden kunnen worden verminderd indien vooraf betere en meer informatie bekend is over respiratoire sensibiliserende eigenschappen van een stof.

6.b Wetenschappelijk belang:

Voor de veiligheid van de werkplek moet onderzocht worden welke stoffen allergisch zijn voor de luchtwegen, en welke niet (maatschappelijke vraag). Bij het huidige onderzoek staat de vraag centraal waarom de antigeniciteit van vluchtige respiratoire allergenen zo moeilijk is aan te tonen (wetenschappelijke vraag). De hypothese is dat dat afhangt van de vochtigheid van de testatmosfeer, die zorgt voor verminderde vluchtigheid en dus een hogere concentratie stof die de luchtwegen bereikt. Als dat zo is heeft dat consequenties voor de omstandigheden op de werkvloer, nl verschil tussen werken onder vochtige en droge omstandigheden (arbeidshygiene; maatschappelijke vraag).

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?

Het onderzoek wordt gevolgd (en betaald) door het ministerie van VWS, dat erg geïnteresseerd is in de luchtwegreacties van klein moleculaire chemicaliën.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

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

- nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
 - wettelijke eis:
 - testrichtlijn:
- ☐ 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 standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

De dieren uit de testgroepen (6 BALB/c muizen per groep) worden op dag 0, 1, en 2 gedurende 1,5 uur per dag via de luchtwegen blootgesteld aan glutaraldehyde (GA) in een head/nose-only inhalatie unit. Deze GA blootstelling vindt plaats als damp (groepen 1 en 2) of als aerosol (groepen 3 en 4) aan een concentratie van 6 ppm (groepen 1 en 3) of 18 ppm (groepen 2 en 4) GA in water. Blootstelling aan damp en aerosol zal plaatsvinden bij een relatieve vochtigheid (RV) van 50% en 100%, respectievelijk. De negatieve inhalatie controlegroep (groep 5) wordt blootgesteld aan lucht.

De dieren uit de positieve controlegroepen worden op dag 0, 1 en 2 dermaal behandeld met 0,25% (groep 6) of 2,5% (groep 7) GA opgelost in aceton-olijfolie 4:1 op de achterkant van beide oren (25 µl per oor). De negatieve dermale controlegroep (groep 8) ontvangt op dezelfde dagen het vehikel (aceton-olijfolie 4:1) op de achterkant van de oren.

Op dag 5 worden alle dieren opgeofferd (pentobarbital narcose) en worden BAL (bronchoalveolaire lavage) vloeistof en drainerende lymfeklieren verzameld. Deze lymfeklieren worden *ex-vivo* behandeld met gelabeld thymidine waarna de lymfocytenproliferatie en cytokinen productie (IL-4, IL-10, IL-12 en IFN-γ) worden bepaald. De lymfeklieren die worden verwijderd zijn de auriculaire voor de dermale route (oren), en de mandibulaire lymfeklieren voor de inhalatoire route. Wanneer macroscopische vergroting van andere lymfeklieren wordt geobserveerd tijdens de sectie, zullen deze ook worden verzameld.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1/2	Inhalatieblootstelling 1,5 uur/dag op dag 0, 1 en 2 aan 6 ppm (groep 1) of 18 ppm (groep 2) GA damp; sectie en verzamelen BAL en lymfeklieren op dag 5	BW	2 X 6	M
3/4	Inhalatieblootstelling 1,5 uur/dag op dag 0, 1 en 2 aan 6 ppm (groep 3) of 18 ppm (groep 4) GA aerosol (100% RV); sectie en verzamelen BAL en lymfeklieren op dag 5	BW	2 X 6	M
5	Inhalatieblootstelling 1,5 uur/dag op dag 0, 1 en 2 aan lucht; sectie en verzamelen BAL en lymfeklieren op dag 5	BW	6	M
6/7	Oorapplicatie (25 µl op de achterkant van elk oor) van 0,25% (groep 6) of 2,5% (groep 7) GA in aceton-olijfolie 4:1 op dag 0, 1 en 2; sectie en verzamelen BAL en lymfeklieren op dag 5	BW	2 X 6	M
8	Oorapplicatie (25 µl op de achterkant van elk oor) van aceton-olijfolie 4:1 op dag 0, 1 en 2; sectie en verzamelen BAL en lymfeklieren op dag 5	BW	6	M

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:

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 behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

Zie vraag 10: 6 dieren per groep, 8 groepen = 48 dieren. 6 Dieren per dosering is een minimaal aantal om variatie op te kunnen vangen. In de dermale LLNA worden 4 dieren per groep gebruikt, maar huidblootstelling is meer gestandaardiseerd dan inhalatoire blootstelling.

Er worden 2 negatieve controle's meegenomen (2 groepen, 6 dieren per groep): een inhalatie controle (lucht) en een dermale controle (aceton-olijfolie op het oor). In deze groepen zal tijdens de diverse bepalingen de achtergrond bepaald worden, ten opzichte waarvan eventuele effecten in de behandelde groepen berekend zullen worden. In het verleden is gebleken dat blootstelling aan een stof via de lucht ook kan leiden tot stimulatie van de auriculaire lymfeklier door opname via de huid. In het huidige experiment zal mede onderzocht worden of dit voor glutaraaldehyde ook het geval is. Wanneer beide negatieve controlegroepen gecombineerd zouden worden, kan dit dus leiden tot interpretatieproblemen achteraf, waardoor misschien het hele experiment herhaald zal moeten worden.

Er worden 4 reservedieren gebruikt. BALB/c muizen zijn erg tere dieren en bij het hanteren, met name het in de tubes plaatsen, kan er gemakkelijk iets mis gaan. Bovendien lopen er momenteel geen andere proeven met deze dieren, waaruit in noodsituaties evt een reservedier gebruikt zou kunnen worden. Het aantal van 4 reservedieren is dus minimaal (minder dan 10%).

Totaal: 48 + 4 reservedieren = 52 dieren

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden 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.

Muis, BALB/c, mannen. De LLNA (OECD test) wordt met muizen uitgevoerd en er is veel ervaring met deze stam in dit soort onderzoek. Meestal worden mannen gebruikt voor de LLNA.

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

Tijdens de blootstelling zitten de dieren in tubes, gedurende de rest van de tijd in groepen van 6 in macrolon bakken met niet-stuivend zaagsel (wood shavings) en kooiverrijking (kartonnen snippers). Voer (korrels) en flessen water.

Verder normale verzorging.

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
1/2/3/4	24	blootstelling aan GA via lucht	3x	3
5	6	blootstelling aan lucht	3x	3 (vanwege tube)
6/7	12	blootstelling aan GA via huid (oor)	3x	2
8	6	blootstelling aan vehikel via huid (oor)	3x	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 behandelings-effect.
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, 2, 3, 4, 5	30	3
6, 7	12	2
8	6	1

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

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

Niets, er is geen aanleiding tot pijnbestrijding.

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

Als de dieren uiterlijke kenmerken van ziekte vertonen bijv. ernstige blijvende ademnood, zal de proef voor het desbetreffende dier snel afgesloten worden. Het wordt echter niet verwacht dat dit zal optreden.

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.

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:

Voor deze studie zijn geen (in vitro) alternatieven, omdat sensibilisatie een systemisch fenomeen is. De metingen (lymfocytenproliferatie en cytokineproductie) zullen ex vivo worden uitgevoerd (zie vraag 9).

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:

☐ 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: zie vraag 21

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:

GA: glutaaraldehyde; LLNA: local lymph node assay

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.