

Datum ontvangst DEC: 28 april 2009 1^e versie
 22 mei 2009 2e versie
 26 mei 2009 3e versie nav vraagbrief

DEC nr: 2774

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:** Zebravis als alternatief toxiciteits model: Toxiciteit van paracetamol

1.2. **studienummer:** (Nog niet bekend)

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

De zebravis: Een alternatief model voor generieke toxiciteitstesten

Bij het opzetten van het zebravis model richten wij ons in eerste instantie op de algemene toxiciteits testen. Hierbij ligt de nadruk op het karakteriseren van de pathologie van de target organen, zoals de lever, de longen en het hart. In de huidige aanvraag willen we de toxiciteit van paracetamol onderzoeken. In een later stadium zullen we andere orgaan-specifieke stoffen testen die we, indien mogelijk, per kort formulier willen aanmelden.

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

[Redacted]

[Redacted]

E-mail adres onderzoeker:

[Redacted]

[Redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr:

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

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

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Externe samenwerking (indien van toepassing): NVT

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: Nog niet bekend

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

[Redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan:

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Pilot dose-range finder

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	89	1	4	37	1	1	5	1	1	1	1	1
2	1	89	1	4	37	1	1	5	1	1	1	1	1
3	1	89	1	4	37	1	1	5	1	1	1	1	1
4	1	89	1	4	37	1	1	5	1	1	1	1	1
5	1	89	1	4	37	1	1	5	1	1	1	1	1

Opm bij 2: het betreft zebravissen verkregen van Erasmus Universiteit Rotterdam

Opm bij 4: het betreft 2 mannelijke en 2 vrouwelijke vissen per groep

Hoofdstudie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	89	1	8	37	1	1	5	1	1	1	1	1
2	1	89	1	8	37	1	1	5	1	1	1	1	1
3	1	89	1	8	37	1	1	5	1	1	1	1	1
4	1	89	1	8	37	1	1	5	1	1	1	1	1
5	1	89	1	8	37	1	1	5	1	1	1	1	1

Opm bij 2 en 3: het betreft zebravissen verkregen van Erasmus Universiteit Rotterdam

Opm bij 4: het betreft 4 mannelijke en 4 vrouwelijke vissen per groep

RELEVANTIE

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

De zebravis is een relatief nieuw dierenmodel voor onderzoek naar humane ziekten. Zo zijn er bijvoorbeeld verschillende modellen ontwikkeld voor hart – en vaatziekten, kanker, spierziekten en neurologische aandoeningen, waaronder Alzheimer. Wij willen deze modellen in de toekomst gaan gebruiken voor gecombineerde “Efficacy/Toxicity studies” waarin nieuwe geneesmiddelen getest zullen worden.

Helaas staat het toxicologisch onderzoek met de zebravis nog in zijn kinderschoenen. Als gevolg hiervan is er weinig tot geen informatie beschikbaar wat betreft de histopathologie, de anatomie, de effecten van toxische stoffen en de gevoeligheid van dit model ten opzichte van andere ‘hogere diersoorten’. Deze kennis zal moeten worden opgebouwd alvorens er nieuwe stoffen in dit model getest kunnen worden. In het kader hiervan willen we een viertal experimenten uitvoeren met stoffen welke toxisch zijn voor target organen zoals de lever, het hart, de nieren en de hersenen. De eerste stof die we willen gaan testen is paracetamol.

De zebravissen worden gedurende de proef (ma t/m vrijdag) dagelijks om de 2 uur geobserveerd (tijdens werktijd) en aan het einde van de proef opgeofferd voor een volledig histopathologische onderzoek.

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**

Er zijn veel zebrawismodellen voor humane ziekten. Deze modellen helpen bij het vinden van nieuwe behandel methoden. Voor de hiermee verbonden “efficacy en safety studies” is het van belang dat we histopathologie van de zebra vis volledig beheersen.

Daarnaast is de zebra vis mogelijk een beter model voor het voorspellen van toxiciteit bij mensen. De klassieke proefdier modellen hebben een overall concordance van 71%. Er zijn echter verschillen per orgaan. Met name de huid en lever hebben een lage concordance. De zebra vis scoort mogelijk beter in bepaalde organen. Beter voorspelling van toxiciteit van nieuwe stoffen, verhoogt de veiligheid van de samenleving. Daarnaast is het economisch gunstiger voor de producenten van nieuwe stoffen.

6.b Wetenschappelijk belang:

De zebra vis is een interessant wetenschappelijk model doordat het relatief eenvoudig is om bepaalde genetische pathways te veranderen met behulp van morpholino's. Hierdoor kan het effect van bepaalde genen op normale en verstoorde ontwikkeling bestudeerd worden. Daar de embryonale ontwikkeling zich buiten de moedervis plaatsvindt, kan dit gemakkelijk bestudeerd worden in microwell systemen. Hierdoor is het mogelijk om, “high throughput”, te screenen voor stoffen die de ontwikkeling van de zebra vis beïnvloeden en/of de afwijking corrigeren. Tegelijkertijd kan er gekeken worden naar de toxiciteit van deze stoffen. Dit is van belang voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen maar ook voor een beter begrip van bepaalde ziekteprocessen.

Om dit in de toekomst mogelijk te maken dienen we meer inzicht te krijgen in de zebra vis als alternatief model voor de generieke toxiciteits testen. In het huidige voorstel concentreren wij ons in eerste instantie op algemeen toxicologisch onderzoek.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?

Het onderzoek is deel van het VP In life Sciences en als zodanig op wetenschappelijke kwaliteit beoordeeld. Het onderzoeksproject is opgesteld door experts in het veld waaronder [redacted] (Neurotox), [redacted] & [redacted] (Reprotox), [redacted] (Immunotox) en [redacted] (Toxicology/Pathology).

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?

Er zal eerst een “dose-range finding” studie worden uitgevoerd om de optimale concentratie te bepalen voor toxicologisch onderzoek. De zebravissen (5 groepen van 4 (2M & 2V) worden op dag 0 in zwemwater geplaatst met daarin 0, 50, 100, 150 of 250 mg/L paracetamol. Na 96 uur zullen de vissen verdoofd/geeuthenaseerd worden door ze te plaatsen in water met Tricaine (400 mg Tricaine, 97.9 ml dH₂O, 2.1 ml Tris (1M pH 7)). Vervolgens worden de vissen gefixeerd in Bouin's fixatief.

Bij de hoofdstudie worden de zebravissen (5 groepen van 8, worden op dag 0 in zwemwater geplaatst met daarin verschillende concentraties paracetamol. (De dosering is afhankelijk van de “dose-range finding” studie)

Na 96 uur worden van de 8 vissen verdoofd/geeuthenaseerd worden door ze te plaatsen in water met Tricaine (400 mg Tricaine, 97.9 ml dH₂O, 2.1 ml Tris (1M pH 7)). Vervolgens worden de vissen gefixeerd in Bouin's fixatief.

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

Dose-range finding studie

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	0 mg/L Paracetamol in zwemwater	Euthenasie d.m.v. Tricaine	4	2M & 2F
2	50 mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	4	2M & 2F
3	100 mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	4	2M & 2F
4	150 mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	4	2M & 2F
5	250 mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	4	2M & 2F

Hoofdstudie (Dosering hangt af van de dose-range finding studie)

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	0 mg/L Paracetamol in zwemwater	Euthenasie d.m.v. Tricaine	8	4M & 4F
2	?* mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	8	4M & 4F
3	?* mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	8	4M & 4F
4	?* mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	8	4M & 4F
5	?* mg/L Paracetamol	Euthenasie d.m.v. Tricaine	8	4M & 4F

** Concentraties zijn afhankelijk van de resultaten van de pilot studie.*

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

Voor de dose-range finding studie hebben we 20 dieren nodig en voor de hoofdstudie 40. Totaal: 60

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

Er wordt gebruikt gemaakt van mannetjes en vrouwtjes zebravissen (AB stam)

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.: Verkregen van de Erasmus Universiteit Rotterdam

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?

De zebravissen worden bij TNO onder standaard condities gehuisvest. In groepen van 4-8.

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.

Dose-range finding studie

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1	4	0 mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	1
2	4	50 mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2
3	4	100 mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2
4	4	150 mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2
5	4	250 mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2

Hoofdstudie (Aantal groepen & dosering hang af van de dose-range finding studie)

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1	8	0 mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	1
2	8	?* mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2
3	8	?* mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2
4	8	?* mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2
5	8	?* mg/L Paracetamol 0.4% Tricaine	96 uur 1x	2

Toelichting:

- Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 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).
- Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandel-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.]

- 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**Pilot studie**

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1 (0 mg/L)	4	1
2 (50 mg/L)	4	2
3 (100 mg/L)	4	2
4 (150 mg/L)	4	2
5 (250 mg/L)	4	2

Hoofdstudie

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1 (0 mg/L)	8	1
2 (? mg/L)*	8	2
3 (? mg/L)*	8	2
4 (? mg/L)*	8	2
5 (? mg/L)*	8	2

* Concentraties zijn afhankelijk van de resultaten van de pilot studie.

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

De vissen worden elke dag geobserveerd en gescreend op afwijkend gedrag dat kan wijzen op pijn, stress of ander ongerief (Zie 19)

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

- Eet niet
- Lethargy/Isolatie
- Operculum flaring
- Ademhalingsfrequentie
- Ademhappend aan oppervlak
- Starre vinnen
- Flashing
- Evenwichtsstoornissen

Klinisch beeld van zieke/gestresste vis

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

NVT

ALTERNATIEVEN

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

De opzet van deze proef is het verkrijgen van kennis in de zebravis als toxicologisch model. Mogelijk dat dit model op korte termijn de rat gaat vervangen in generieke toxiciteitstesten. Dit zou vervanging betekenen van een hogere met een lagere diersoort. Mogelijk dat dit model voor sommige organen een betere voorspellende waarde heeft ten op zichte van de huidige klassieke modellen zoals de rat. Dit leidt mogelijk tot een vermindering van het aantal dierproeven.

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

O zo nee; waarom niet: (Zie 21) Zebravis wordt gezien als alternatief voor hogere diersoorten.

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 NVT

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

Onderzoeker

Management

datum: 28 april 2009

datum: 28 april 2009

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