

Datum ontvangst DEC: 9 maart 2011
24 maart 2011 final

DEC nr: 3085

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient voor de uiterste inzendtermijn (zie Spider, cluster onderzoekers Art.9) volledig ingevuld elektronisch in het bezit te zijn van:

E-mail: [redacted]

Postadres:

[redacted]
[redacted]
[redacted]

telefoon: [redacted]

Kerngebied en locatie: [redacted]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: Toepassen van huidmicrodialyse ten behoeve van het bepalen van transport en metabolisme van organofosfaten in de huid

1.2. studienummer:

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

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

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder tel nr: [redacted]

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

Externe samenwerking (indien van toepassing): experimenten nalv [redacted], waar resultaten uit vorig onderzoek werden bevestigd in een varkensmodel

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: zsm ca april 2011

(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 jaar

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	1	04	1	6	03	1	1	01	07	4	4	1	1
2	1	04	1	6	03	1	1	01	07	4	4	1	1
3	1	04	1	6	03	1	1	01	07	4	4	1	1
(reserve)	1	04	1	2	03	1	1	01	07	4	4	1	1

RELEVANTIE

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

In welke mate kan snelle en vertraagde ontسمetting met RSDL de depotvorming van VX in de huid, gemeten mbv huidmicrodialyse, opheffen?

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

De huid is de natuurlijke barrière, maar ook porte d'entree voor stoffen van buitenaf. De huid beïnvloedt de snelheid van opname van een stof in het lichaam. Daarnaast kan in de huid een zogenaamd depot van de toxische stof gevormd worden, zoals bij het zenuwgas VX. In vivo experimenten in een vorig experiment hebben dit laten zien. Ontsmetting wordt daardoor sterk bemoeilijkt, met als gevolg dat vanuit het depot een continue afgifte van de stof naar het bloed kan plaatsvinden. De huid bevat verschillende enzymen die bijdragen aan het metabolisme van stoffen die via de huid het lichaam binnengaan. Dit proces resulteert doorgaans in ontgiftiging, maar kan ook resulteren in bioactivatie (zoals in het geval van parathion), waardoor een buiten het lichaam onschadelijke stof (parathion) in de huid wordt omgezet naar een stof (paraoxon) die wel zeer schadelijk is.

Het doel van dit project is het met behulp van de microdialysetechniek real-time de penetratie door en metabolisme in de huid te kunnen volgen, om zo doende een bijdrage te kunnen leveren aan een volledig beeld van contactrisico en het gedrag van chemische strijdmiddelen en de effectiviteit van vroege en late ontسمetting hierop in de huid.

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

Ondanks de Chemische Wapenconventie (1997) is er sprake van een sterke dreiging vanuit met name landen die de Chemische wapenconventie niet willen ratificeren. De Nederlandse militair loopt derhalve risico's te worden blootgesteld aan chemische wapens, zeker binnen de nieuwe doctrine van de Krijgsmacht, waarbij inzet vnl. "out of area" zal geschieden in het kader van "peace-keeping" operaties. Bovendien lopen ook burgers risico om met chemische strijdmiddelen in aanraking te komen door terrorisme, zoals in de sarin aanval in de metro in Tokyo, of het gebruik van organofosfaten door extremistische bewegingen.

6.b Wetenschappelijk belang:

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

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Intern is het voorstel besproken met o.a. [REDACTED]

[REDACTED], en Ministerie van Defensie.

Daarnaast vindt binnen het kader microdialyse/ huidmetabolisme samenwerking plaats met de afdeling [REDACTED]. De expertise van [REDACTED] op het gebied van microdialyse in de hersenen, wordt nu ingezet om het gedrag van stoffen in de huid op een alternatieve manier naast in vitro methoden te bestuderen.

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)

- 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.

Plaatsen microdialyse probe guide en sampling canule:

Mannelijke cavia's zullen worden geanestheiseerd met isofluraan, inleiding 4%, onderhoudsdosering 2-3 %. Een artiele canule zal worden aangelegd in de a. carotis tbv het nemen van bloedsamples. In de huid zal 1 lineaire microdialyseprobe geplaatst worden onder de plaats van opbrengen van het organofosfaat (linkerschouder). De probes, (met een 10 mm lengte membraan en een doorsnede van ca 350 µM) worden geplaatst door een 21 G naald in de dermis te plaatsen, waar de probe doorheen geschoven wordt. Daarna wordt de probe vastgezet met een druppeltje weefselijm. De probe wordt gedurende 30 minuten geequibreerd door met een snelheid van 5 µl/min Ringeroplossing door de probe te leiden (fysiologische oplossing).

Meting

De volledige meting zal plaats vinden onder anesthesie. Het dier wordt op temperatuur gehouden mbv een warmtematje. Boven de plaats van de probe op de linkerschouder wordt een dosis VX (500 µg/kg) opgebracht, opgelost in IPA (oplossing 32 mg/ml, 16 µl/kg). Gedurende de 6 volgende uren worden microdialysaten opgevangen in 20-30 minuten samples. In groep 2 en 3 wordt na 15 resp. 90 min de opbrengplaats ontsmet met RSDL (gedurende enkele minuten wordt RSDL op een gaasje op de opbrengplaats gesmeerd) Daarnaast worden ieder uur plasma samples afgenomen via de carotis canule (6* 500 µl). Na applicatie van de organofosfaten wordt ter voorkoming van ademhalingsproblemen tijdens de anesthesie ten gevolge van bronchoconstrictie en eventuele slijmvorming atropine toegediend via een i.m. injectie (5 mg/kg)

Euthanasie

Aan het einde van de meting worden de dieren geeuthanaseerd dmv een overdosis nembutal via de canule (0.3 ml iv). De plasma en microdialysaat samples worden geanalyseerd met behulp van GC en MS analyse op de aanwezigheid van de organofosfaten en hun metabolieten. Na afloop wordt de plaats van de probe in de dermis geverifieerd mbv histologie (vriescoupees) en worden de stoffen uit de geëxposeerde en referentieplaatsen in de huid geëxtraheerd.

Rationale volumina bloodsamples: Van iedere cavia wordt 6 keer bloed afgenomen in een tijdsperiode van 6 hr. Binnen 24 hr is het verantwoord 20% van het circulerend volume af te nemen. Het circulerend volume in de cavia's is ca 0.5*64 ml: ongeveer 32 ml. 20% hiervan is 6,4 ml. De samples zullen ong 500 µl per keer bedragen (voldoende voor detectiemethode weten we uit ervaring, waarmee het totale volume ver onder het verantwoorde volume blijft. Voor deze berekeningen is gebruik gemaakt van Diehl et al. Journal of Appl. Tox 2001; "A good practice..."

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	PC blootstelling 500 µg/kg VX onder anesthesie	Inhalatieanesthesie isoflurane gedurende 6-7 uur, plaatsing canule in a. carotis, plaatsing microdialyseprobe in huid (2st), opbrengen VX, bloedsampling onder anesthesie	6	M

2	PC blootstelling 500 ug/kg VX onder anesthesie + ontsmetting na 15 minuten	Inhalatieanesthesie isoflurane gedurende 6-7 uur, plaatsing canule in a. carotis, plaatsing microdialyseprobe in huid, opbrengen VX RSDL ontsmetting, bloedsampling onder anesthesie	6	M
3	PC blootstelling 500 ug/kg VX onder anesthesie + ontsmetting na ca 90 minuten (optreden van verschijnselen)	Inhalatieanesthesie isoflurane gedurende 6-7 uur, plaatsing canule in a. carotis, plaatsing microdialyseprobe in huid, opbrengen VX RSDL ontsmetting, bloedsampling onder anesthesie	6	M
RESERVE	Voor groep 1 t/m3	Als groep 1 t/m3	2	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.

Per groep wordt uitgegaan van 6 dieren. Eerdere studies met VX in [] en de studies in uitgevoerd [] gaven met dit aantal een goed resultaat met een acceptabele SEM (~10%).

Er zal gestart worden met 3 maal 4 dieren, die zo nodig aangevuld worden met 3*2 of 3*1 of eventueel geen extra dieren.

Er worden 2 reservedieren opgevoerd in het plan, die als vervanging van dieren uit groep 1 t/m 3 worden gebruikt (en dan pas besteld) indien er iets mis is gegaan in de initiële fase met 3*4 dieren.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

Mannelijke haarloze cavia's zullen worden gebruikt. De huid van de cavia is een goede modelhuid voor die van de mens als het varken. De percutane blootstellingsroute wordt toegepast in zowel de cavia als het varken (bij buitenlandse collega's). De resultaten van de experimenten vullen elkaar aan en op dit gebied is er sprake van data-uitwisseling, mede naar aanleiding van 3 mnd werkbezoek bij de buitenlandse collega's.

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke cavia's om invloeden op kinetiek ten gevolge van de vrouwelijke cyclus uit te sluiten.

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.

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:

- 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.

Standaard huisvesting TNO [REDACTED], i.e. per 2-3 in macrolon Type IV (hoog model)bakken met bedding en kooiverrijking, (b.v.. huisje en evt knaagblokjes) en kamers met klimaatcontrole., met *ad libitum* toegang tot water en voer. Na aankomst van de dieren kunnen zij gedurende 1 week acclimatiseren voor aanvang van het experiment.

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	18	Onder Anesthesie: im injectie, canulering, probeplaatsng, toediening,	6 hr	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 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.]
- 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	18	1
Reserve	2	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.
De volledige procedure vindt plaats onder anesthesie.

19. **Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?**
Wanneer de dieren verschijnselen van vergiftiging vertonen die niet door atropine voorkomen worden.

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.

Mogelijke complicaties zouden zich kunnen voordoen ten gevolge van vergiftigingsverschijnselen na de blootstelling. Omdat de procedure onder anesthesie plaatsvindt, verwachten we niet dat de dieren hiervan ongerief ondervinden. Daarnaast worden de te verwachten verschijnselen zoals speekselvloed, slijmvorming in trachea, en bronchoconstrictie, behandeld met atropine tbv het experiment. Uit ervaring met percutane besmettingen weten we dat de gevolgen van de besmetting enkele uren op zich laten wachten door de barrierefunctie van de huid, en mogelijk tijdens de duur van dit experiment niet optreden omdat de stof nog niet of nauwelijks in de circulatie komt. Het proces in de huid zal nader onderzocht worden in dit project.

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 het bestuderen van processen in de huid wordt gebruik gemaakt van in vitro methodes. De resultaten uit dit experiment zijn echter relevant voor de levende huid.. De relatie tot (toxico)kinetiek zoals te onderzoeken in deze aanvraag kan echter niet met in vitro methoden onderzocht worden.

VX is niet direct "toxisch" in de huid, dwz, er is geen sprake van irritatie of corrosie. Het probleem bij een huidbesmetting met een organofosfaat zoals VX is dat er een depot ontstaat in de huid, waaruit voortdurend besmetting van het organisme plaatsvindt (zoals eerder gevonden in studies met percutane VX besmetting). Dit verloop is slecht voorspelbaar. Late ontsmetting is minder effectief dan directe ontsmetting, maar het is nog wel de vraag hoe lang er nog wel VX uit de huid verwijderd kan worden waardoor de opvolgende behandeling minder lang zou hoeven zijn. Behandeling dient namelijk plaats te vinden tot alle VX uit het systeem geelimineerd is. Het meten van het verloop van VX levels in de huid en tegelijkertijd in bloed en de eventueel daarbij behorende verschijnselen, zal bijdragen aan begrip over mogelijke depotvorming in de huid en behandelingsmethoden hiervoor (balans tussen latere ontsmetting, besmetting wordt namelijk pas laat opgemerkt en mogelijkheden voor sneller herstel/ kortere behandeling).

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

In de planning wordt voorkomen dat meer dieren gebruikt worden dan noodzakelijk voor het bepalen van de effectiviteit van huidontsmetting op kinetiek en accumulatie van stoffen in de huid

22. **Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:**
- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
 - ☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED])
 - ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
 - ☐ elders, n.l.:
 - ☐ zo nee; waarom niet: zie antwoord 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:

RSDL: Reactive Skin Decontamination Lotion

IPA: Isopropylalcohol

VX: Venom X (O-ethyl-S-2-diisopropylaminoethyl-methylphosphonothiolate

Im: intramusculair

Iv: intraveneus

Pc: percutaan

GC en MS: gaschromatografie en massaspectrometrie

[Redacted signature area]

datum:

datum:

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