

2011-15

Datum ontvangst DEC: 10 augustus 2011

DEC nr: 3149

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 UITTESTEN VAN EEN NIEUWE BATCH BLEOMYCINE IN LONG FIBROSE IN MUIS EN RAT

.studienummer:

1.1. 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 telnr: [redacted]

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

Externe samenwerking (indien van toepassing): n.v.t

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 1 September 2011

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v.

DEC nr., via e-mail: [redacted]

Geplande duur van de onderzoeksplan: 3 maanden

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	01	1	6	03	1	1	1	05	4	1	3	1
2-4	1	01	1	18	03	1	1	1	05	4	1	4	1
5	1	02	1	6	03	1	1	1	05	4	1	3	1
6-8	1	02	1	18	03	1	1	1	05	4	1	4	1

RELEVANTIE

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

Bepalen optimale concentratie bleomycine (nieuwe batch) voor inductie long fibrose in muis en rat

In het kader van zijn fibroseprogramma biedt TNO onder andere het bleomycine geïnduceerde longfibrose (BILF) in de muis en de rat aan (zie bv longfibrose: DEC 1422, 2055, 2487, 2520). In dit model wordt long fibrose geïnduceerd door bleomycine in de longen van de dieren te injecteren. Hiervoor wordt gebruikt gemaakt van een vaste batch bleomycine (clinical grade) omdat we in het verleden geleerd hebben dat er duidelijke verschillen in activiteit tussen de verschillende batches bestaan. De huidige batch vervalt aan het einde van het jaar. In dit experiment zal de optimale dosering van een nieuwe batch bleomycine worden bepaald. Omdat er in het verleden ook is gebleken dat er voor optimale inductie in muizen en ratten verschillende doseringen noodzakelijk zijn, zal deze dosering zowel in rat als in muis worden vastgesteld. Hopelijk komt hieruit dat de verhouding tussen dosis in de rat en de muis constant is, zodat in de toekomst maar in 1 diersoort zal moeten worden getest.

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

Er is geen therapie beschikbaar ter voorkoming van fibrose. Fibrose zelf is een chronische aandoening die tot ernstige gezondheidsproblemen kan leiden en heeft levens bedreigende aspecten als het de long, lever of nier betreft. Longfibrose is een chronische, inflammatoire aandoening van de long met een slechte prognose en een slechte respons op bestaande therapiemogelijkheden. Longfibrose leidt tot een sterk gereduceerde longfunctie en daaraan gekoppeld een hoge mortaliteit (binnen 5 jaar na constatering van de ziekte is er 50-70% kans op overlijden).

6.a.2 Economisch belang

Het chronische karakter van de ziekte en de toenemende mate van invaliditeit/morbiditeit bij progressie brengt met zich mee dat deze categorie patiënten in toenemende mate arbeidsongeschikt worden en een beroep moeten doen op uitkeringen

(indirecte kosten). Tevens zijn de directe kosten van fibrose (gezondheidszorg) aanzienlijk. Geneesmiddelen tegen fibrose zullen leiden tot een aanzienlijke kostenbesparing en verhoging van de arbeidsparticipatie.

6.a.3 Milieu belang

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

Het chronische karakter van de ziekte is in toenemende mate belastend (zowel fysiek als psychisch) voor de patiënt en voor de directe familie/verzorgenden.

6.b Wetenschappelijk belang:

In de laatste tien jaar is er binnen TNO Kwaliteit van Leven grote expertise opgebouwd op het gebied van aandoeningen aan de extracellulaire matrix / bindweefsels, waaronder fibrose. Dit onderzoek is gericht op het verkrijgen van inzichten in ziekteprocessen (therapie targets), het ontwikkelen van biomarkers voor deze aandoeningen en het testen van nieuwe therapeutica. De huidige studie is onderdeel van het derde aspect: het testen van nieuwe anti-fibrotica.

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?

Het protocol is tot stand gekomen in nauw overleg met [REDACTED] op het gebied van [REDACTED].

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?

Inductie long fibrose muis: longfibrose wordt geïnduceerd door intra-tracheale instillatie van 30 µl bleomycine in PBS (doses: 50% huidige dosis, 100% huidige dosis, 150% huidige dosis). De oplossing wordt tijdens de dormicum/dormidor/fentanyl anesthesie toegediend met een tridak-stepper injectiespuit (type 4.0.0.1). Hiermee wordt de oplossing middels 1 puls van 30 µl in de longen gespoten. Om de juiste positionering van de spuit in de trachea optisch te kunnen controleren, wordt het halsgebied met een sterke lamp verlicht. Na instillatie worden dormicum en dormidor geantagoneerd middels antisedan/anexate.

Inductie long fibrose rat: longfibrose wordt geïnduceerd door intra-tracheale instillatie van 200 µl bleomycine in PBS (doses: 50% huidige dosis, 100% huidige dosis, 150% huidige dosis). De oplossing wordt tijdens de dormicum/dormidor/fentanyl anesthesie toegediend met een vernevelaar op een injectiespuit. Hiermee wordt de oplossing middels een puls van kleine druppeltjes in de longen gesprayd. Om de juiste positionering van de spuit in de trachea optisch te kunnen controleren, wordt het halsgebied met een sterke lamp verlicht. Na instillatie worden dormicum en dormidor geantagoneerd middels antisedan/anexate.

Wegen: gewichten van de dieren zullen 3 x per week worden bepaald

Offeren: dieren worden geofferd mbv CO₂ en vervolgens worden weefsels en bloed verzameld. Fibrose inductie zal worden bepaald dmv histologische analyse, biochemische bepaling van collagen gehalte. Ook zal materiaal voor ingevroren voor mogelijke additionele analyses.

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

GROEP	INDUCTIE	Dosis bleomycine	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	n	SEXE
1 (muis) 5 (rat)	Intratracheal: saline		-inductie longfibrose: *Anesthesie (intraperitoneal mbv DDF). -wegen -Opofferen op dag 21	6	♀♀
2 (muis) 6 (rat)	Intratracheal: Bleomycine	50% huidige dosis		6	♀♀
3 (muis) 7 (rat)	Intratracheal: Bleomycine	100% huidige dosis		6	♀♀

4 (muis) 8 (rat)	Intratracheal: Bleomycine	150% huidige dosis		6	♀♀

- 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:**

in dit deel zullen 6 muizen/ratten per groep worden gebruikt. Dit is voldoende om de spreiding en de gemiddelde effecten van de bleomycine te kunnen beoordelen. Hierbij is rekening gehouden dat 1 dier per groep mogelijk voortijdig uit het experiment moet worden genomen op grond van excessief gewichtsverlies of door acute problemen na de intratracheale instillatie.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

Dezelfde sexe/stam als gebruikt in de eerdere DEC protocollen: vrouwelijke C57BL/6J muizen, 10-12 weken oud (20-22gr) of volwassen vrouwelijke Wistar ratten (200gr). Deze stammen zijn gevoelig voor de ontwikkeling van fibrose en zijn de standaard stammen die in vergelijkbare studies in de literatuur zijn gebruikt.

- 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?**

- 7 a 8 muizen per type III bak, met kooiverrijking en Type 4 bak: 2 ratten per IV bak, met een kartonnen koker als kooiverrijking.

Water (pH 2.8) en voedsel: ad libitum (Ssniff, Hope Farms). Het voedsel zal in de bak zelf worden gelegd (niet op de bovenkant van de kooi) indien verzwakking van de dieren zichtbaar is, zodat verzwakte dieren toch gemakkelijk bij het eten kunnen. Dit heeft bij het voorgaande experiment aanzienlijk geholpen om het gewicht van de dieren op peil te houden.

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
1-8	48	Intratracheale injectie onder narcose	15', 1x	3
1-8	48	Dieren wegen (3x per week)	15 x	1
2-4, 6-8	36	Long fibrose ontwikkeling	14 d	4
1-8	92	Euthanasie	1x	1

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 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.]
- 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, 5	12	3
2-4, 6-8	36	4

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

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

Bij intratracheale toediening van bleomycine (éénmalig) wordt anesthesie toegepast (intraperitoneaal) met DDF. Het voedsel wordt in de bakken zelf geplaatst. Indien noodzakelijk zullen brokken geweekt in glucose oplossing in de bakken van de erg verzwakte dieren worden geplaatst, zodat ze gemakkelijker voedsel tot zich kunnen nemen. Ook zal fokvoer in plaats van normaal voer gebruikt worden, om de verwachte afname in lichaamsgewicht te compenseren.

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

Dieren worden dagelijks beoordeeld op algehele conditie, activiteit, ademhaling en vacht. De dieren zullen uit experiment worden genomen (euthanaseert mbv CO₂) indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreedt. Zoals niet meer eten, aanhoudend trillen, niet reageren op prikkels, ademhalingsproblemen, doffe smerige vacht, ernstig gewichtverlies (> 20%) etc.).

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.

Door bleomycine kunnen de dieren eventueel een lokale infectie oplopen. Bij intratracheale instillatie: ademhalingsproblemen na ontwaking uit de narcose. Indien dit gebeurt, sterven de dieren meestal binnen enkele minuten na ontwaking uit de narcose. We houden rekening met 10% uitval door laatstgenoemde handeling.

Tijdens de eerste 9-10 dagen na bleomycine inductie is in de longfibrose groep een geleidelijke afname van het lichaamsgewicht te verwachten, daarna neemt het gewicht weer langzaam toe tot waarden gelijk aan of hoger dan het startgewicht. De experimenten worden dusdanig gepland, dat het 9 en 10 dagen tijdpunt niet in het weekend valt, zodat optimale controle op het dierenwelzijn mogelijk is.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef? Er zijn geen geschikte alternatieven voor deze *in vivo* ziektemodellen voorhanden vanwege complexiteit van opeenvolgende weefselreacties (migratie-proliferatie-inflammatie-lokale differentiatie en homing) op een fibrotische trigger.

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:

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. [REDACTED]
- ☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED])
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- ☐ elders, n.l.:
- ☒ zo nee; waarom niet:

- (1) Bekendheid uit de literatuur dat deze proeven niet met geïsoleerde cellen (bijv. fibroblasten) kunnen worden uitgevoerd i.v.m. samenspel van verschillende cel (release groeifactoren, cel/cel interacties, cel/matrix interacties)
- (2) reeds eerder Art. 14 functionaris geraadpleegd bij vorige DEC aanvragen.

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.

Het bleomycine geïnduceerde long fibrose model is in de portefeuille opgenomen van [REDACTED] vanwege de sterk toenemende interesse van farmaceutische bedrijven in de aandoening fibrose.

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

- DDF : dormicum/dormidor/fentanyl anesthesie
- IPF : Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Onderzoeker

[REDACTED]

Management

[REDACTED]

datum: 2011

datum: 2011

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