

Datum ontvangst DEC:

DEC nr:

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:

Secretariaat DEC en proefdierdeskundige

[redacted]
[redacted]

telefoon: [redacted] (secretariaat) [redacted] (proefdierdeskundige)

Kerngebied en locatie: [redacted]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: Microdosing van VX en HI-6 in de cavia

1.2. studienummer:

titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing): KaV-onderzoeksproject 'Microdosing en alternatieve diermodellen'

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): nvt

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 14 november 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 weken

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	4	37	1	1	01	07	4	4	1	1
2	1	04	1	4	37	1	1	01	01	4	4	1	1
3	1	04	1	2	37	1	1	01	07	4	4	1	1
Reserve	1	04	1	2	37	1	1	01	01/0 7	4	4	1	1

RELEVANTIE

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

- Hoe bruikbaar is microdosing in het onderzoek naar de lotgevallen van zenuwgassen in proefdieren, dit in het licht van het feit dat de voornaamste ontgiftingsprocessen verzadigbaar zijn?
- Hoe bruikbaar is microdosing in farmacokinetische studies van antidoten tegen zenuwgassen in de cavia?
- Heeft het gebruik van Accelerometer Massaspectrometrie (AMS) toegevoegde waarde bij het bestuderen van de interactie tussen antidoten en zenuwgassen in de cavia?

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

Ondanks de inwerkingtreding van het Chemische Wapensverdrag in 1997 is de dreiging die uitgaat van chemische wapens nog niet afgenomen. Deze dreiging gaat uit van de staten die het verdrag niet hebben geratificeerd, maar ook van terroristische organisaties, die geen boodschap hebben aan dit verdrag.

De Nederlandse Krijgsmacht wordt hedentendage vnl. ingezet voor 'out-of-area' operaties, met als doel de stabiliteit in de betrokken landen te herstellen. Tijdens deze missies bestaat de kans dat Nederlandse militairen worden aangevallen met chemische wapens. Dat dit niet denkbeeldig is blijkt uit de aanslagen op Amerikaanse troepen met chloorgas, de eerste van de moderne chemische wapens, in Irak in maart 2007.

Daarnaast wordt door onze overheid ook geanticipeerd op de mogelijkheid van aanslagen met chemische wapens in Nederland door terroristische organisaties, waarbij voornamelijk burgerslachtoffers zullen vallen, en met aanslagen op Nederlandse staatsburgers in het buitenland. Dit met de aanslag door de Aum Shinrikyo sekte in de metro van Tokyo met het zenuwgas sarin in 1995 voor ogen. Er is reden om aan te nemen dat een aantal terroristische organisaties belangstelling heeft voor chemische wapens, en dan met name voor zenuwgassen. Zo bestaan er bijvoorbeeld video-opnamen van een training in het gebruik van chemische wapens en van de dodelijk uitwerking van een zenuwgas op honden, beide afkomstig van Al-Qaeda. Om zowel onze militairen als burgers te kunnen beschermen in geval van een incident

met zenuwgassen is het wenselijk te kunnen beschikken over adequate antidoten waarvoor diepgaand inzicht in de lotgevallen van zenuwgassen in het lichaam vereist is.

6.b Wetenschappelijk belang:

Recent is een technologie op het toneel verschenen waarmee het mogelijk is door toediening van een zeer lage dosis de lotgevallen van een radioactief-gemerkt stof in het menselijk lichaam te bestuderen, 'microdosing' geheten. Deze technologie maakt gebruik van de meest gevoelige massaspectrometrische detectie die op dit moment bestaat: accelerometer massaspectrometrie (AMS). De AMS die bij TNO [REDACTED] staat is geoptimaliseerd voor het meten van ^{14}C . De gevoeligheid die de AMS kan halen met ^{14}C ligt in de attomolair range, hetgeen ruim drie orden van grootte gevoeliger is dan met de massaspectrometrische methoden die momenteel in [REDACTED] in gebruik zijn. Laatstgenoemde methoden zijn op dit moment de gouden standaard op analysegebied.

Een beperkt aantal, veelbelovende resultaten van studies waarin microdosing wordt vergeleken met conventionele studies in mensen is gepubliceerd, o.a. met de voor defensieonderzoek relevante farmaca diazepam en midazolam. De EMEA en FDA accepteren de resultaten van microdosing studies in het geneesmiddelregistratietraject.

Aangezien een dosis wordt toegediend die geen schadelijk effect veroorzaakt is het denkbaar dat deze technologie wordt toegepast voor het bestuderen van de lotgevallen van toxische stoffen in de mens en van experimentele geneesmiddelen. Microdosing kan uiteraard ook worden toegepast in proefdieren, waarbij tevens hogere doseringen kunnen worden onderzocht en de resultaten verkregen in mens en dier kunnen worden vergeleken.

Voorgesteld wordt om microdosing toe te passen op het bestuderen van de lotgevallen van het zenuwgas VX na percutane toediening aan de haarloze cavia. In dit experiment zal middels microdialyse in de huid het percutane proces worden gevolgd, waarvoor de AMS naar verwachting voldoende gevoeligheid biedt. Een bijzonder aspect van microdosing van zenuwgassen is dat verzadigbare processen een voornamelijk rol spelen in de ontgiftiging van deze stoffen, hetgeen leidt tot niet-lineaire (toxico)kinetiek. Tot op heden is microdosing toegepast op stoffen met een lineaire kinetiek.

Tevens wordt voorgesteld om de farmacokinetiek van het zenuwgas antidotum HI-6 te bestuderen mbv microdosing in vergelijking met een conventionele dosis. In dit experiment zal middels microdialyse in de hersenen de penetratie van deze verbinding in dit targetorgaan worden bepaald, waarvoor de AMS naar verwachting een betere gevoeligheid biedt dan tot op heden gebruikte methoden. In die gevallen moesten veel hogere, minder relevante doseringen HI-6 gebruikt worden.

Tot slot wordt voorgesteld om middels AMS de lotgevallen van HI-6 te bestuderen in de cavia die blootgesteld is aan VX. Omdat het denkbaar is dat de bloedhersenbarrière meer permeabel wordt door de zenuwgasvergiftiging, zal ook hier microdialyse in de hersenen worden toegepast voor analyse van HI-6 in dit targetorgaan.

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?

Intern TNO is het onderzoeksplan beoordeeld en goedgekeurd door Dr. [REDACTED] principal scientist. Het projectvoorstel is beoordeeld en goedgekeurd door Prof Dr. [REDACTED] [REDACTED] manager [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?

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.

Alle groepen:

Na aankomst te [] zullen de dieren eerst minimaal een week de gelegenheid krijgen om te acclimatiseren.

Groep 1:

Plaatsen microdialyse probe guide en sampling canule:

Mannelijke cavia's zullen worden geanestheseerd met isofluraan, inleiding 4%, onderhoudsdosering 2-3 %. Een canule zal worden aangelegd in de *vena jugularis* tbv het nemen van bloedsamples. In de huid zal 1 lineaire microdialyseprobe geplaatst worden onder de plaats van opbrengen van het zenuwgas (linkerschouder). De probes, (met een 10 mm lengte membraan en een doorsnede van ca 350 µm) worden geplaatst door een 21G 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 geëquilibreerd door met een snelheid van 5 µl/min Ringer-oplossing door de probe te leiden (fysiologische oplossing). Tijdens de operatie worden de dieren op temperatuur gehouden mbv een warmtemat.

Toxicokinetisch experiment

Het experiment zal in zijn geheel geschieden onder isofluraan-anesthesie. Het dier wordt op temperatuur gehouden mbv een warmtemat. Boven de plaats van de probe op de linkerschouder wordt de gewenste dosis ¹⁴C-VX (500 µg/kg in het 'conventionele' experiment (n=2), 5 µg/kg in het microdosing experiment (n=2)) opgebracht in 20 µl/kg (oplossing 2-propanol). Gedurende de 6 volgende uren worden microdialysaten opgevangen in 20-30 minuten samples.

Bloedmonsters van 500 µl worden via de jugularis canule afgenomen vlak voor applicatie van VX (t=0), en op 1, 2, 3, 4, 5 en 6 uur na applicatie. Na bloedafname wordt de canule gevuld met fysiologisch zout met heparine (500 IU/ml).

Na applicatie van VX 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 het experiment (t=6 uur) worden de dieren geëuthanaseerd dmv een overdosis Nembutal® via de canule (0.3 ml i.a.). Huid, lever, longen, nieren en hersenen worden bemonsterd. Tezamen met de bloedmonsters zullen deze worden geanalyseerd met de AMS te [REDACTED]

Groep 2

Plaatsen microdialyse probe guide en sampling canule

Onder isofluraan anesthesie (4-5% inleiding, 2-3% onderhoud), wordt het dier in de stereotact geplaatst. Na plaatsing van het dier in de stereotact, wordt een guide voor een microdialyse probe in de hersenen geplaatst. Dit geschiedt door middel van het boren van een gaatje in de schedel, waarlangs de guide, volgens vaste coördinaten, ventraal naar de gewenste diepte wordt gebracht met behulp van een stereotactische micromanipulator. Na het in positie brengen van de guide, wordt deze vastgezet aan een schroefje in de schedel met tandartsceement. Tot slot wordt de huid rondom de probe gesloten. Tijdens de operatie wordt de schedel additioneel lokaal verdoofd met 2% lidocaine.

Daarna zal een canule in de vena jugularis worden geïnstalleerd tbv bloedsampling.

Na afloop van de operatie (het dier blijft in narcose) wordt een microdialyseprobe in de guide geschoven, waarna de flow met Ringer-oplossing door de probe wordt gestart om te stabiliseren gedurende minimaal 45 minuten.

Tijdens de operatie en het experiment, wordt het dier wordt op temperatuur gehouden door middel van een heating pad.

Experiment

Na de stabilisatieperiode wordt ¹⁴C-HI-6 intramusculair toegediend (100 mg/kg in het 'conventionele' experiment (n=2) en 1 mg/kg in het microdosing experiment (n=2), injectievolume 0.5 ml/kg, stof opgelost in fysiologisch zout). Het microdialysaat wordt op 0, 5, 10, 20, 40, 80 en 160 minuten worden verzameld. Bloedmonsters van 500 µl worden via de jugularis canule afgenomen vlak voor toediening van HI-6 (t=0) en op 5, 10, 20, 40, 80 en 160 minuten. Na bloedafname wordt de canule gevuld met fysiologisch zout met heparine (500 IU/ml).

Euthanasie

Aan het einde van het experiment (t=160 min) worden de dieren geëuthanaseerd dmv een overdosis Nembutal® via de canule (0.3 ml i.a.). Spier van injectieplaats, lever, longen, nieren en hersenen worden bemonsterd. Tezamen met de bloedmonsters zullen deze worden geanalyseerd met de AMS te [REDACTED]

Groep 3

Plaatsen microdialyse probe guide en sampling canule

Dit geschiedt op dezelfde wijze als bij Groep 2.

Experiment

Het experiment zal in zijn geheel geschieden onder isofluraan-anesthesie. Het dier wordt op temperatuur gehouden mbv een warmtemat. Boven de plaats van de probe op de linkerschouder wordt de gewenste dosis VX (500 µg/kg) opgebracht in 20 µl/kg (oplossing in 2-propanol).

Na applicatie van VX 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).

Op 2 uur na applicatie van VX wordt ¹⁴C-HI-6 intramusculair toegediend (100 mg/kg, injectievolume 0.5 ml/kg, stof opgelost in fysiologisch zout). In dit experiment worden uitsluitend de 'conventionele' doses van VX en HI-6 gebruikt, derhalve geldt n=2.

Het microdialysaat wordt op 0, 5, 10, 20, 40, 80 en 160 minuten worden verzameld. Bloedmonsters van 500 µl worden via de jugularis canule afgenomen vlak voor toediening van HI-6 (t=0) en op 5, 10, 20, 40, 80 en 160 minuten. Na bloedafname wordt de canule gevuld met fysiologisch zout met daarin heparine (500 IU/ml).

Euthanasie

Dit geschiedt op dezelfde wijze als bij Groep 2.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	Percutane blootstelling zenuwgas VX	Isofluraan anesthesie gedurende ± 7 uur; Inbrengen microdialyse probe in huid; Inbrengen canule in <i>vena jugularis</i> ; Opbrengen VX op de huid; Intramusculaire toediening atropinesulfaat; Afnemen bloedmonsters via canule; Euthanasie	4	M
2	Intramusculaire toediening HI-6	Isofluraan anesthesie gedurende ± 4 uur; Inbrengen microdialyse probe in hersenen; Inbrengen canule in <i>vena jugularis</i> ;	4	M

		Intramusculaire toediening HI-6; Afnemen bloedmonsters via canule; Euthanasie		
3		Isofluraan anesthesie gedurende ± 7 uur; Inbrengen microdialyse probe in hersenen; Inbrengen canule in <i>vena jugularis</i> ; Opbrengen VX op huid; Intramusculaire toediening atropinesulfaat; Intramusculaire toediening HI-6; Afnemen bloedmonsters via canule; Euthanasie	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.

Het doel van alle 3 aspecten van het onderzoeksplan is het verkennen van de toegevoegde waarde van microdosing cq. AMS voor het medisch-gerelateerd defensieonderzoek. Er wordt niet gestreefd naar een grootschalige studie waarmee statistische significantie wordt verkregen; de insteek is een exploratieve studie waarmee zoveel mogelijk informatie wordt verkregen om een goed oordeel over de bruikbaarheid van microdosing te verkrijgen. Vandaar dat wordt voorgesteld $n=2$ te hanteren per behandeling. Voor groepen 1, 2 en 3 komen de totalen daarmee op respectievelijk 4, 4, en 2.

Er worden 2 reservedieren opgevoerd in het onderzoeksplan, die als vervanging van dieren uit groep 1 t/m 3 worden gebruikt (en dan pas besteld) indien er onverhoopt iets mis gaat in de preparatie van de dieren, bijv. bij het plaatsen van de microdialyse probes.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

Mannelijke haarloze cavia's zullen worden gebruikt, met een aanvangsgewicht van *ca* 300 g. Er is gekozen voor deze species om een aantal redenen.

- de cavia is een algemeen geaccepteerd diersmodel voor *in vivo* onderzoek met zenuwgassen en antidoten daartegen;
- de haarloze variant van de cavia is een algemeen geaccepteerd model in studies waarin percutane blootstelling aan chemische strijdmiddelen geschiedt;
- alle eerdere experimenten met betrekking tot toxicokinetiek en therapie van zenuwgasvergiftiging zijn eveneens met de cavia is uitgevoerd. Dit maakt het mogelijk om de verkregen resultaten te vergelijken met de resultaten die in eerder onderzoek zijn verkregen.

Traditioneel wordt dit soort onderzoek uitgevoerd met mannelijke dieren, dit omdat uit diverse studies is gebleken dat de vrouwelijke hormonale cyclus invloed heeft op de mate waarin zenuwgassen toxisch zijn. Tevens kan niet worden uitgesloten dat de toxicokinetiek en eliminatieroutes ook hierdoor worden beïnvloed.

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. Specificiteer bij vraag 8.

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.

Standaard huisvesting TNO lokatie [REDACTED] i.e. per 2-3 in macrolon Type IV bakken met bedding en *ad libitum* toegang tot water en voer, en kamers met klimaatbeheersing tot de start van het experiment. Kooiverrijking is aanwezig in de vorm van houten blokjes en hooi.

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	4	<u>Onder anesthesie</u> : plaatsing probe, canulering, p.c applicatie VX, i.m. toediening atropine, bloedafname, i.a. toediening Nembutal [®]	Max 7 uur	1
2	4	<u>Onder anesthesie</u> : plaatsing probe, canulering, i.m. toediening HI-6, bloedafname, i.a. toediening Nembutal [®]	Max 4 uur	1
3	2	<u>Onder anesthesie</u> : plaatsing probe, canulering, p.c applicatie zenuwgas, i.m. toediening atropine, i.m. toediening HI-6, bloedafname, i.a. toediening Nembutal [®]	Max 7 uur	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	4	1
2	4	1
3	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.

Voor alle groepen geschieden de experimenten in zijn geheel 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 (groep 1) of atropine en HI-6 (groep 3) voorkomen worden. De kans hierop is uiterst klein. Ernstige effecten van vergiftiging door VX na percutane toediening in deze dosering treedt pas na een uur of 8 in.

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 in groepen 1 en 3 ten gevolge van vergiftigingsverschijnselen na de blootstelling aan VX. 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, vrijwel zekere afdoende behandeld met atropine. Uit ervaring met percutane besmettingen met VX weten we dat de gevolgen van de besmetting met deze dosis enkele uren op zich laten wachten door de barrièrefunctie van de huid, en waarschijnlijk mogelijk tijdens de duur van dit experiment niet optreden omdat de stof nog niet of nauwelijks in de circulatie komt.

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:

Bestudering van de toxicokinetiek van zenuwgassen kan uitsluitend in het intacte dier worden verricht. Middels microdosing is het denkbaar dat op termijn de toxicokinetiek van VX zou kunnen worden onderzocht in menselijke vrijwilligers. Op dit moment is echter niet duidelijk of microdosing bruikbaar is in geval van niet-lineaire kinetiek, vandaar deze dierproef.

De farmacokinetiek van HI-6 kan worden bepaald in menselijke vrijwilligers, maar het is daarbij niet mogelijk om de concentratie van de stof op de meest cruciale plek, nl. in de hersenen te meten. Ook in dit geval moet worden vastgesteld of het geven van een 'microdosis' kinetisch gezien maatgevend is voor de normaal gebruikte, therapeutische dosis.

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

Nvt. De experimenten worden in zijn geheel uitgevoerd onder narcose. Tevens wordt getracht zoveel mogelijk informatie uit elk dierexperiment te halen.

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

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

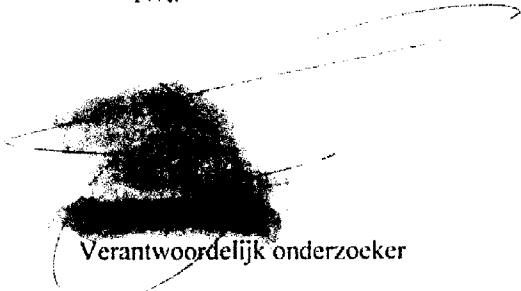
ANDERE ASPEKTEN

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

Nvt.

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

Nvt.


Verantwoordelijk onderzoeker

datum: 01-11-2011


Research manager

datum: 01-11-2011

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