

Datum ontvangst DEC 21-10-2006

DEC nr 2233

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO**AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

██████████
██████████

E-mail: ██████████

telefoon: ██████████ / fax: ██████████

Instituut: TNO ██████████

ALGEMEEN

1. **Titel van het onderzoeksplan:** Effectiviteit van een nieuwe behandeling tegen organofosfaat vergiftiging.

Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

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

E-mail adres onderzoeker: ██████████

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: ██████████

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

Externe samenwerking (indien van toepassing):

3. **Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:** December 2006

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

Geplande duur van de onderzoeksplan: 1 maand

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO ██████████

4. **Codenummers* volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:**

| groep | < kolommen > | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------|----|---|-------------|----|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1 | 1 | 04 | 1 | 6 | 03 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| 2 | 1 | 04 | 1 | 6 | 03 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| 3 | 1 | 04 | 1 | 6 | 03 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 4 | 1 | 04 | 1 | 2 (reserve) | 03 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1 | 1 | 4 | 1 |

RELEVANTIE

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

De beschermende werking van de voorbehandeling tegen organofosfaatvergiftiging berust op het feit dat een deel van enzym acetylcholinesterase (AChE) wordt afgeschermd tegen de inwerking van het organofosfaat. Uit eerdere studies blijkt dat profylaxe met fysostigmine in combinatie met scopolamine of procyclidine een acceptabele bescherming biedt tegen organofosfaatvergiftiging. Fysostigmine met procyclidine blijkt zelfs als therapie (dus na intoxicatie) effectief te zijn. Er zijn aanwijzingen uit de literatuur dat de beschermende werking van fysostigmine niet alleen berust op de enzymremming maar dat directe effecten op o.a. nicotinereceptoren hierbij een rol spelen.

Inderdaad, in een voorgaande studie (DEC no 1796) bleek dat het afdekken van nicotinereceptoren een belangrijke invloed speelt bij de bescherming tegen soman vergiftiging. Eveneens bleek uit een andere studie die in 1998 is uitgevoerd dat de nicotine antagonist mecamlamine in combinatie met fysostigmine tot 100% overleving zonder intoxicatie verschijnselen te resulteren. Waarom we niet verder gegaan zijn met mecamlamine is vanwege de nevenwerkingen. Dit middel mag ook niet aan mensen worden toegediend maar wordt uitsluitend voor wetenschappelijke doeleinden gebruikt. De gekozen teststof voor deze aanvraag is een zeer potente antagonist van nicotinereceptoren zonder nevenwerkingen. Deze reeds geregistreerde stof wordt bovendien aan mensen voorgeschreven voor behandeling tegen nicotineverslaving zonder nadelige nevenwerkingen. Wij willen met deze studie aantonen dat de teststof inderdaad een grote potentie heeft in de bescherming tegen soman vergiftiging.

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a Maatschappelijk belang:

6.a.1 Gezondheid mens/dier

De huidige bescherming tegen organofosfaatvergiftiging bestaat uit een profylaxe en een post-intoxicatie therapie. Deze behandeling is effectief om de overleving te vergroten maar voorkomt niet het optreden van post-intoxicatie symptomen en incapacitering na blootstelling. Het maatschappelijke belang is om uiteindelijk een betere bescherming tegen de schadelijke inwerking van organofosfaten te verkrijgen. Dit betreft zowel in een militaire setting als in een civiele omgeving waarbij blootstelling aan o.a. pesticiden kan plaatsvinden of bij een terroristische dreiging.

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

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

6.b Wetenschappelijk belang:

De huidige behandeling tegen organofosfaatvergiftiging bestaat uit een profylaxe en een therapie. Deze benadering werkt in op het proces van remming van het enzym acetylcholinesterase door soman: het voorkomen van binding aan het enzym door soman, het afdekken van muscarinereceptoren, het reactiveren van het geremde enzym. Deze behandeling beschermt tegen de letale effecten van soman maar niet tegen de post-intoxicatie symptomen en de incapacitering na blootstelling. Daarom wordt naar een verbeterde alternatief gezocht. Er bestaat het vermoeden dat het werkingsmechanisme van de profylaxe fysostigmine niet alleen berust op de remming van acetylcholinesterase -het enzym waarop organofosfaten aangrijpen - maar ook op directe effecten op receptoren. De succesvolle behandlingsstof fysostigmine heeft namelijk, in tegenstelling tot pyridostigmine, een sterke affiniteit voor de nicotine receptor. Uit recente bevindingen binnen ons instituut (studie met DEC no 1796) blijkt inderdaad dat de rol van nicotine receptoren

vermoedelijk erg groot is. Hiervoor zijn ook aanwijzingen uit de literatuur (Albuquerque *et al.* 1988)¹. Dit verklaart de veel betere bescherming die het carbamaat fysostigmine biedt ten opzichte van het carbamaat pyridostigmine. Procyclidine, een veelbelovende kandidaatstof voor profylaxe en therapie blijkt naast de NMDA receptor ook te binden aan de nicotine receptor. Het beoogde positieve effect van procyclidine zou dus wel eens kunnen liggen aan de binding aan de nicotine receptor en niet aan de NMDA receptor zoals wij eerst vermoedde. Dit vermoeden wordt bevestigd door het succes van de behandeling met de nicotine antagonist mecamylamine als toevoeging aan de fysostigmine behandeling waarbij de symptomen en de post-intoxicatie incapacitering tot nul gereduceerd werd (studie uit 1998, nog niet gepubliceerd). Onder punt 5 heb ik al aangegeven waarom we toen niet verder gegaan zijn in deze richting. Het blokkeren van de nicotine receptor blijkt erg gevaarlijk te zijn leidend tot ernstige bijwerkingen. De stof die wij nu in gedachten hebben is een nicotine antagonist die precies op dezelfde bindingsunits van de receptor binden zonder bijwerkingen. Dit middel is zelfs al geregistreerd als medicijn voor humaan gebruik. De effectiviteit van fysostigmine in combinatie met de teststof zal om deze reden getest worden als mogelijke therapie. Deze behandeling zal vergeleken worden met de behandeling van fysostigmine allen en de teststof alleen.

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 betreft hier een studie welke is voorgelegd aan deskundigen binnen de BU Biologische en Chemische Bescherming (■■■■■■, toxicoloog, ■■■■■■, pharmaceut, en ■■■■■■, chemicus). Zij hebben dit plan positief beoordeeld. Het betreft hier een verkennende studie om de potentie van de teststof vast te stellen.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

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

- nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, Vervolg op DEC-advies nr.: o.a. DEC no 1796.
- 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 standaardprotocol voor de nadere uitwerking.

¹ Albuquerque EX, Aracava Y, Cintra WM, Brossi A, Schonenberger B, Deshpande SS. Structure-activity relationship of reversible cholinesterase inhibitors: activation, channel blockade and stereospecificity of the nicotinic acetylcholine receptor-ion channel complex. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 1173-1196, 1988.

De cavia's worden random ingedeeld in drie groepen. Alle dieren worden vooraf voorzien van een identificatie chip. Deze chip detecteert eveneens de lichaamstemperatuur. Op tijdstip 0 krijgen alle dieren een subcutane injectie met 2x LD₅₀ soman (48 ug/kg, 1 ml/kg) toegediend. Een minuut later worden ze behandeld met – afhankelijk van de testgroep – de combinatie van fysostigmine (0,3 mg/kg) en teststof (80 mg/kg) (groep 3) of alleen fysostigmine (groep 1) of teststof (groep 2). De dosis fysostigmine is gebaseerd op de enzymremming van het enzym AChE. Deze dosis fysostigmine leidt tot een remming van ca 30%. De dosis van de teststof is gebaseerd op gegevens van de kinetiek in cavia's. De stoffen worden middels een subcutane injectie toegediend in een volume van 1 ml/kg. Bij alle behandelingen bestaat het oplosmiddel uit PZ. Vervolgens wordt het optreden van intoxicatie symptomen nauwkeurig geobserveerd gedurende twee uur. Daarna zal indien nodig de dieren worden geobserveerd (met een lagere frequentie). Gedurende de observatie periode van 2 uur wordt met behulp van de chip-scanner de temperatuur van de dieren iedere 5 minuten gemeten om de conditie van de dieren te monitoren.

Dieren die comateus raken worden eerder uit de proef gehaald omdat de ervaring leert dat deze dieren de nacht niet overleven. Op deze manier kan onnodig lijden worden voorkomen. 24 na intoxicatie zal het lichaamsgewicht van de dieren worden geregistreerd en een laatste observatie en temperatuur registratie plaatsvinden. Hierna is het experiment ten einde.

Na deze studie zijn de dieren niet meer inzetbaar voor andere experimenten en zullen zij direct na beëindigen van de studie worden afgevoerd via de afdeling biotechniek en euthanasie toegepast door inhalatie met CO₂/carbogeen.

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

| GROEP | BEHANDELING | BIOTECHNISCHE HANDELING(EN) | AANTAL | SEXE |
|-------|---|---|--------|------|
| 1 | 2xLD ₅₀ soman, fysostigmine | Subcutane injectie van soman en therapie, Observaties van symptomen, Telemetrische temperatuur registratie | 6 | man |
| 2 | 2xLD ₅₀ soman, teststof | idem | 6 | man |
| 3 | 2xLD ₅₀ soman, fysostigmine en teststof | idem | 6 | man |
| 4 | Reserve dieren | idem | 2 | man |

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 protocol:

Voor deze studie worden 20 cavia's gebruikt (inclusief 2 reserve dieren). Om uit de resultaten van de gedragsobservaties goede conclusies te kunnen trekken voor de bruikbaarheid van de teststof als behandeling tegen organofosfaat vergiftiging zijn er minimaal 6 dieren nodig.

Als gevolg van onvoorziene voorvallen zoals het niet werken van de temperatuur chip zullen de reserve dieren ingezet kunnen worden.

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.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. **Welke diersoort, en ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:** Dunkin-Hartley albino cavia's CrL(HA)BR, mannetjes met een startgewicht van ca 350-400 gram. Het werken met het intacte dier is noodzakelijk wanneer het onderzoek zich richt op overleving en symptomen. Er is gekozen voor de cavia om twee redenen. De eerste is dat de cavia voor deze *in vivo* experimenten een goed model is voor onderzoek met cholinesteraseremmers. Dit komt door de lagere hoeveelheden carboxylesterase in het plasma, wat als scavenger kan dienen voor de OPs, vergeleken met de rat. De tweede reden is dat alle eerdere experimenten met betrekking tot de profylaxe en therapie eveneens met de cavia is uitgevoerd. Dit maakt het mogelijk om de resultaten te vergelijken met de resultaten uit eerder onderzoek. Bovendien blijkt uit onderzoek dat het metabolisme van bupropion in cavia's het meest overeenkomt met die in de mens. (Suckow et al., 1986)²

Welke sexe wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe: mannelijke cavia's.

Doordat eerdere experimenten reeds uitgevoerd zijn in de mannelijke cavia van deze soort kunnen de resultaten goed vergeleken worden wat als extra informatie kan dienen.

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:**

- euthanasie
- gebruik voor een volgende proef
- andere vergunninghouder
- anders, n.l.:

15. **Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?**

Vermeldt groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

De cavia's worden in verband met de intensieve observaties tijdens de testdag standaard, individueel gehuisvest (Makrolon type IV). Tijdens de quarantaine periode mogen de dieren sociaal gehuisvest zijn.

² Suckow RF, Smith TM, Perumal AS, Cooper TB. Pharmacokinetics of bupropion and metabolites in plasma and brain of rats, mice, and guinea pigs. Drug Metab Dispos. 1986 Nov-Dec;14(6):692-699

Daarom wordt ook gekozen M.b.t. het houden cq. behandelen van de proefdieren bij TNO [REDACTED], wordt verwezen naar: [REDACTED], getiteld "Bestellen en huisvesten van proefdieren", waarin uitvoerig staat beschreven over doel, toepassing, uitvoering, werkwijze, ontvangst, uitgifte, huisvesting, gezondheidsbewaking, afvoer, kwaliteitsbewaking en [REDACTED], getiteld "Schoonmaken en onderhouden van de dierkamers", waarin uitvoerig staat omschreven over doel, werkkleding, schoonmaken, reinigingsmiddelen, voer, bedding, materialen, ruimte, gedragsregels, kwaliteitsbewaking en veiligheid, en [REDACTED] getiteld "Voorschriften en regels voor gedragsfaciliteit [REDACTED]", waarin hetzelfde voor de gedragsfaciliteit staat beschreven. Aangenomen wordt, dat de DEC bekend is met de hierboven genoemde werkvoorschriften en deze in haar bezit heeft.

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.

Verwacht wordt dat de behandeling van groep 3 zodanig goed werkt dat de dieren na blootstelling aan soman geen seizures vertonen. De andere twee groepen zouden mogelijk wel symptomen kunnen vertonen. Deze kunnen variëren van kauwen en lichte trillingen tot convulsies. De symptomen houden bij behandelde dieren over het algemeen een tot twee uur aan. Indien er toch heftige symptomen optreden zal dit proces vrij snel verlopen. Het begint met kauwen en trillen. Een paar minuten later zijn er convulsies waarneembaar. Tijdens deze convulsies vertonen de hersenen 'seizures' welke reeds optreden voor de convulsies starten. Deze elektrische potentialen komen overeen met de status epilepticus. Hiervan is bekend dat tijdens deze processen het bewustzijn is uitgeschakeld. Daarom wordt de intoxicatie ingedeeld in matig/ernstig korter dan een dag. Voor groep 3 wordt dit ingeschat op matig korter dan een dag. Kortom: Blootstellen aan 2xLD₅₀ organofosfaat: matig of matig/ernstig (korter dan 1 dag).

17. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):

| Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief | | Duur van het ongerief | | | |
|---|------------------|--|-----------|------------|------------|
| | | < 1 dag | 1-7 dagen | 7-30 dagen | > 30 dagen |
| Mate van ongerief | A: gering | | | | |
| | B: gering/matig | | | | |
| | C: matig | N= 6 (groep 3) | | | |
| | D: matig/ernstig | N= 12 (groep 1 en 2) N=2 (reserve dieren) | | | |
| | E: ernstig | | | | |
| | F: zeer ernstig | | | | |

Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.

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

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

Geen verdere pijnbestrijding tijdens de studie. Er worden geen ingrepen verricht die tot pijn leiden.

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

Als blijkt dat, na intoxicatie met soman, de dieren na het optreden van de eerste symptomen geen herstel vertonen en comateus raken zal het eindpunt bespoedigd worden om onnodig lijden te voorkomen. Het is onze ervaring dat dieren die comateus raken niet herstellen en spontaan binnen 24 uur overlijden. In dat geval zal bij die dieren euthanasie gepleegd worden (zie punt 9 onderaan).

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.

Voor zover bekend zijn er geen bijkomende risico's.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning) bestaan voor deze dierproef? Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven in dit geval niet bruikbaar zijn:

Bij onderzoek waarbij gekeken wordt naar gedragsbeïnvloeding en overleving na intoxicatie is het noodzakelijk te werken met het intacte dier. Gezien de aard van het onderzoek is het niet mogelijk te werken met vrijwilligers.

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], tel [REDACTED])

Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

elders, n.l.:

zo nee; waarom niet: Dit is eerder gedaan bij recente vergelijkbare experimenten (verder zie 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 ander aspecten zijn m.i. van belang voor de DEC-commissie.

Onderzoeker

[REDACTED]

Manager Operations

[REDACTED]

datum:

datum:

Na behandeling:
secretaris DEC