

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:** Luchtwegallergie: inhalatoire LLNA (Local Lympe Node Assay) – Onderzoek naar cryolite in ‘potroom’ astma

1.2. **studienummer:** 8424

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

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

E-mail adres onderzoeker: [REDACTED] / [REDACTED]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [REDACTED] / [REDACTED]

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

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

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

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

[REDACTED])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 12 dagen

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [REDACTED]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1/2/3/4/5	1	01	2	30*	33	1	1	05	05	1	1	3	1
6/7/8	1	01	2	18*	33	1	1	05	07/08	1	1	2	1
9	1	01	2	6*	33	1	1	05	01	1	1	1	1

* plus 4 reservedieren (in totaal)

RELEVANTIE

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

In de door de OECD geaccepteerde Local Lymph Node Assay (LLNA) worden stoffen dermaal getest op zowel de mogelijkheid om sensibiliserend te zijn (potential) als de mate waarin ze dat zijn of bij welke dosis ze dat zijn (potency). In een vorige studie (DEC aanvraag 1909 en 2206) werden allergenen zowel dermaal als inhalatoir getest. Op het vluchtige formaldehyde na waren alle geteste allergenen positief maar huidallergenen waren potenter via de huid en luchtwegallergenen waren potenter via inademing. Er is een verklaring gevonden waarom een vluchtig allergen zoals formaldehyde niet positief was in een respiratoire LLNA: onder vochtige omstandigheden was een ander aldehyde, namelijk glutaraaldehyde, wel positief, op basis van de eerste resultaten, omdat de stof niet zo snel verdampte als onder droge omstandigheden, en de lokale concentratie (dwz de concentratie per allergen-presenterende cel in de luchtwegen) dus hoger was (DEC aanvraag 2684). In deze studie willen we met de respiratoire LLNA de vraag beantwoorden of cryoliet, dat verdacht wordt een belangrijke rol te spelen in 'potroom astma' (astma die optreedt in o.a. smelterijen is een groot probleem in die industrie, zie proefschrift van Bas Sorgdrager van het Ned. Centrum voor Beroepsziekten), een sensibiliserende (via huid of luchtwegen) stof is. De respiratoire LLNA zal worden uitgevoerd met AlNa₃F₆ (cryolite), omdat deze stof veel voor komt op de werkplek en bovendien wordt gezien als de stof die het meeste aan astma is gerelateerd. Van cryoliet zijn geen huid sensibilisatie gegevens bekend (geen dermale LLNA, maximization of Buehler test). Daarom moet naast de respiratoire LLNA ook een dermale LLNA test worden gedaan omdat de dermale LLNA nog steeds de standaard is voor sensibilisatie, ook als het om luchtwegallergie gaat.

De proef wordt zo uitgevoerd dat proliferatie van lymfocyten kan worden bepaald *ex vivo* (vermindering benodigd radioactief materiaal en dus ook afval, geen injectie van proefdieren met radioactief materiaal nodig) en tegelijkertijd de cytokine productie kan worden gemeten. Dit betekent dat meteen informatie over Th1 versus Th2 respons wordt verkregen. Op deze manier worden 2 testen ineen geschoven, wat een leidt tot een belangrijke reductie in aantal proefdieren, al moet worden opgemerkt dat voor de cytokinebepaling wel 6 dieren per groep nodig zijn vanwege de geringe opbrengst aan lymfocyten in muizen. Daarnaast kan met de cytokine meting mogelijk gebruikt worden om te bepalen of een positieve respons wel het gevolg is van een specifieke actie van de stof, of een gevolg is van aspecifieke stimulatie van de lymfocyten (een *modified LLNA*).

De industrie heeft veel belangstelling voor dit werk en heeft al geholpen bij de keuze van de stof. De blootstelling is gebaseerd op eigen ervaring (DEC 1909 en 2206), literatuur gegevens en gegevens verstrekt door de industrie.

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: op de werkplek worden zeer veel mensen blootgesteld aan stoffen die wel/niet immunologisch gemedieerde luchtwegreacties kunnen veroorzaken. Op dit moment zijn er geen gevalideerde (dier-)modellen die stoffen kunnen screenen op dergelijke eigenschappen. Deze studie vormt een onderdeel van de ontwikkeling van een proefdiermodel, maar wordt ook gebruikt om het gedrag van metalen te bepalen, wat gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van *ex vivo* en *in vitro* modellen.

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3: Mensen die een beroepsallergie ontwikkelen kunnen daar jaren zeer veel last van hebben (ook nadat ze al lang niet meer worden blootgesteld); beroepsallergie kan zelfs fataal zijn. Kosten die gemoeid zijn bij medicatie van beroepsastma zouden kunnen worden verminderd indien vooraf betere en meer informatie bekend is over respiratoire sensibiliserende eigenschappen van een stof op de werkplek.

6.b Wetenschappelijk belang: Het maatschappelijk belang (gezondheid) staat bij deze proeven voorop.

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

Het onderzoek wordt gevolgd (en betaald) door het ministerie van VWS, dat erg geïnteresseerd is in de luchtwegreacties van klein moleculaire chemicaliën.

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

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)
- 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.

De dieren uit de inhalatie testgroepen (6 BALB/c muizen per groep) (groepen 1, 2, 3 en 4) worden op dag 0, 1 en 2 inhalatoir, in een head/nose-only unit, blootgesteld aan AlNa₃F₆ waarbij verschillende tijdsduren worden gehanteerd per groep (6 uur, 3 uur, 1.5 uur en 45 min, respectievelijk), zodat verschillende doses worden verkregen. Deze blootstelling vindt plaats als droog aerosol aan een concentratie van 100 mg/m³ in lucht. De concentraties en blootstellingsduur zijn gebaseerd op eigen ervaring met een soortgelijke stof (TNO-rapport [REDACTED]), en literatuur gegevens.

De negatieve inhalatie controlegroep (groep 5) wordt inhalatoir blootgesteld aan lucht gedurende 6 uur per dag op dag 0, 1 en 2.

De dieren uit de dermale testgroepen (6 BALB/c muizen per groep) (groepen 6, 7 en 8) worden op dag 0, 1 en 2 dermaal blootgesteld aan 1, 5 of 20% AlNa₃F₆ opgelost in aceton-olijfolie 4:1 op de achterkant van beide oren (25 ul per oor). De concentraties en blootstellingsduur zijn gebaseerd op literatuur gegevens (Basketter *et al*, 1999).

De dieren uit de negatieve dermale controlegroep (groep 9) worden blootgesteld aan het vehikel (aceton-olijfolie 4:1) op de achterkant van beide oren op dag 0, 1 en 2.

Op dag 5 worden alle dieren opgeofferd (pentobarbital narcose) en worden drainerende lymfeklieren verzameld. Deze lymfeklieren worden *ex-vivo* behandeld met gelabeld thymidine waarna de lymfocytenproliferatie en cytokinen productie (IL-4, IL-10, IL-12 en IFN- γ) worden bepaald. Het voordeel van deze methode is dat, buiten een reductie van radioactief afval, de dieren niet *in-vivo* met radioactief materiaal hoeven te worden behandeld. De lymfeklieren die worden verwijderd zijn de auriculaire en mandibulaire lymfeklieren. Wanneer macroscopische vergroting van andere lymfeklieren wordt geobserveerd tijdens de sectie, zullen deze ook worden verzameld.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1/2/3/4	Inhalatoire blootstelling aan AlNa3F6 op dag 0, 1 en 2 gedurende 6 uur (groep 1), 3 uur (groep 2), 1,5 uur (groep 3) of 45 min (groep 4) per dag; sectie en verzamelen lymfeklieren op dag 5.	BW	4x6	M
5	Inhalatoire blootstelling aan lucht op dag 0, 1 en 2 gedurende 6 uur; sectie en verzamelen lymfeklieren op dag 5.	BW	6	M
6/7/8	Oorapplicatie (25 µl op de achterkant van elk oor) met AlNa3F6 in aceton-olijfolie 4:1 op dag 0, 1 en 2; sectie en verzamelen lymfeklieren op dag 5.	BW	3x6	M
9	Oorapplicatie (25 µl op de achterkant van elk oor) met aceton-olijfolie 4:1 op dag 0, 1 en 2; sectie en verzamelen lymfeklieren op dag 5.	BW	6	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.

Zie vraag 10: 6 dieren per groep, 9 groepen = 54 dieren + 4 reservedieren. 6 Dieren per dosering is een minimaal aantal om variatie op te kunnen vangen, met name in de respiratoire LLNA. Bovendien is het voor de *ex vivo* cytokine profilering nodig om minimaal 6 dieren te gebruiken (zie ook kanttekening bij vraag 5 Relevantie). Dus voor de dermale LLNA zijn ook 6 i.pl.v. 5 dieren nodig. Er is voor gekozen om mannetjes te gebruiken, want daarmee zijn tot nu toe alle voorgaande respiratoire LLNA gedaan. Uit eerder onderzoek is ons niet gebleken dat vrouwtjes gevoeliger zouden zijn, ook niet met dermale applicatie. Theoretisch kan het vehicle invloed hebben op de lymfocyten proliferatie, en omdat voor de respiratoire LLNA een ander vehicle wordt gebruikt dan voor de dermale LLNA zijn er twee controle groepen nodig. Bovendien worden de dieren voor de respiratoire LLNA in een tube gezet, wat theoretisch ook invloed kan hebben op de immuunrespons. Als we hiermee geen rekening houden lopen we het risico dat de resultaten niet gepubliceerd kunnen worden in een *peer reviewed* tijdschrift.

Er worden 4 reservedieren gebruikt. BALB/c muizen zijn erg tere dieren en bij het hanteren, met name het in de tubes plaatsen, kan er gemakkelijk iets mis gaan. Bovendien lopen er momenteel geen andere proeven met deze dieren, waaruit in noodsituaties evt een reservedier gebruikt zou kunnen worden. Het aantal van 4 reservedieren is dus minimaal (minder dan 10%).

Totaal: 58 dieren

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

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.

Muis, BALB/c, mannen. De LLNA (OECD test) wordt met muizen uitgevoerd en er is erg veel ervaring met deze stam in dit soort onderzoek. Meestal worden mannen gebruikt voor de LLNA.

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?

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

Tijdens de inhalatoire blootstelling zitten de dieren in tubes, gedurende de rest van de tijd in groepen van 6 in macrolon bakken met niet-stuivend zaagsel (wood shavings) en kooiverrijking (kartonnen snippers). Voer (korrels) en flessen water. Verder normale verzorging.

Er is een ruime ervaring met het huisvesten van 6 mannelijke dieren/kooi na de blootstelling (DEC aanvraag 1906, 2206, 2684), en is tot nu toe nooit een probleem gebleken.

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
1/2/3/4	24	Blootstelling aan AlNa3F6 via lucht	3x	3
5	6	Blootstelling aan lucht	3x	3 (vanwege tube)
6/7/8	18	Blootstelling aan AlNa3F6 via huid (oor)	3x	2
9	6	Blootstelling aan aceton-olijfolie 4:1 via huid (oor)	3x	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 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.]
- 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
1,2,3,4,5	30	3
6,7,8	18	2
9	6	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.

Niets, er is geen aanleiding tot pijnbestrijding.

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

Als de dieren uiterlijke kenmerken van ziekte vertonen bijv. ernstige blijvende ademnood, zal de proef voor het desbetreffende dier snel afgesloten worden. Het wordt echter niet verwacht dat dit zal optreden.

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.

Er worden geen bijkomende risico's verwacht.

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 deze studie zijn geen (in vitro) alternatieven, omdat sensibilisatie een systemisch fenomeen is. De metingen (lymfocytenproliferatie en cytokineproductie) zullen ex vivo worden uitgevoerd (zie vraag 9).

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

n.v.t.

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: zie 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:

LLNA: local lymph node assay

onderzoeker

Management

datum:

datum:

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