

## 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

[REDACTED]

[REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

telefoon: [REDACTED] / fax: [REDACTED]

Instituut:

## ALGEMEEN

## 1. Titel van het onderzoeksplan:

The effects of the ingestion of three strains of probiotics on allergic sensitization in a peanut allergy model in the mouse

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

Kennisinvesterings project (2008) 'Voedselallergie, darmgezondheid en immuunmodulatie'

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

E-mail adres onderzoeker: [REDACTED]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: [REDACTED]

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

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

## 3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

19 september 2008

**Geplande duur van de onderzoeksplan:**

in-life 31 dagen + acclimatisatie periode (5-12 dagen)

**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
1-5	1	01	2	40	05	1	7	01	01	1	1	3	1
reserve	1	01	2	4	05	1	7	01	01	1	1	1	1

## RELEVANTIE

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

Heeft de orale toediening van probiotica invloed op de ontwikkeling van voedselallergie

**6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:**

De aandacht voor het onderwerp 'voedselallergie' neemt nog steeds toe. Recente literatuur geeft aanwijzingen dat het toedienen van specifieke probiotica een gunstig effect kan hebben op ontstekingsremmende en tolerogene immuun responsen. Aangezien er in het geval van voedselallergie er een ontregeld immuunsysteem is, is het derhalve van maatschappelijk en wetenschappelijk belang om nieuwe probiotica te testen of ze een gunstig effect hebben voor de behandeling / preventie van voedselallergie.

**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

**6.b Wetenschappelijk belang:**

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

De wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan is gestaafd aan de huidige stand van zaken met betrekking tot wetenschappelijke publicaties in dit veld en is getoetst door [REDACTED] (Physiological Sciences, TNO), [REDACTED] (Microbiology, TNO), [REDACTED] (TAP, TNO) en [REDACTED] (IRAS, Universiteit Utrecht).

## PROEFOPZET

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

- nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan (ook bij eerder gebruikte modellen, maar nieuwe behandeling)
- herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DEC-advies nr.:
- 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.

5 groepen C3H/HeOuJ muizen worden gebruikt van 8♀/groep (40 totaal; leeftijd 4-5 wk oud).

Groepen 1 t/m 4 worden vanaf dag -14 tot aan dag 31 (sectie) 3x per week oraal blootgesteld aan verschillende stammen probiotica (groepen 2, 3 en 4) of PBS (controle groep 1) d.m.v. gavage. De toe te dienen dosis probiotica is  $10^9$  CFU/dier/dosis.

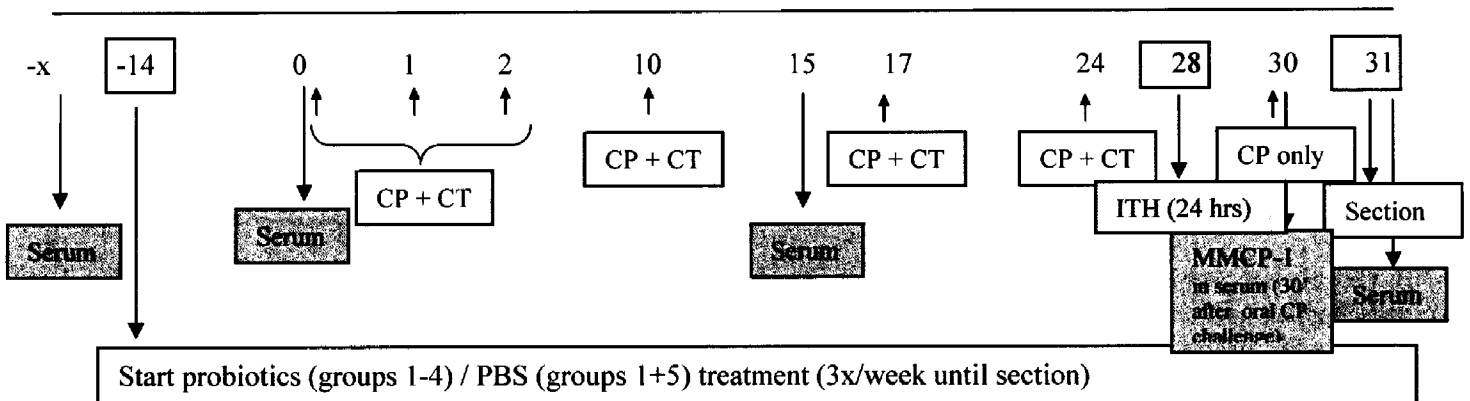
Bovendien worden alle dieren oraal gesensitiseerd d.m.v. gavage met CT + CP op de dagen 0, 1, 2, 10, 17 en 24. Bij alle dieren worden voor de studie start (dag -14) en op de dagen 0 en 15 bloed verzameld voor serum via

staartvene. Op dag 28 krijgen alle dieren een s.c. injectie in het oor met CP voor het meten van een immediate type overgevoeligheidsreactie (ITH). Op dag 30 worden alle dieren oraal gechallengeerd met CP, waarna evt. klinische symptomen voor anaphylaxie worden gevolgd. Dertig minuten na challenge wordt serum verzameld (via orbita) voor het meten van mestcel-degranulatie in het bloed. Op dag 31 worden de dieren gedood en worden bloed (serum), milt, GALT (gut associated lymphoid tissue), faeces, colon en ileum verzameld voor meten van verscheidene parameters:

- Orgaan gewichten: milten, mesenteriale LN, Peyerse platen
- Histologie: Colon, ileum, Milt (deel), GALT (deel)
- mRNA isolatie voor analyse eiwit expressie: milt (deel), mesenteriale lymfeklieren (deel), peyerse platen (deel)
- Pinda-specifieke / totaal immuunglobulines: serum, faeces
- Pinda-specifieke cytokine productie : milt, GALT
- Lymphocyten subset + activatie analyse: mesenteriale lymfeklieren

Groep 5 wordt niet blootgesteld aan probiotica en worden niet met CT + CP gesensitiseerd. Zij dient als negatieve controle voor de pinda-sensibilisatie. De dieren worden 3x per week oraal blootgesteld aan PBS d.m.v. gavage. Zij worden oraal behandeld d.m.v. gavage met PBS op de dagen 0, 1, 2, 10, 17 en 24. Bij alle dieren worden voor de studie start (dag -14) en op dagen 0 en 15 bloed verzameld voor serum via staartvene. Op dag 28 krijgen alle dieren een s.c. injectie in het oor met CP voor het meten van een vertraagd type overgevoeligheidsreactie (DTH) na 48 uur. Op dag 30 worden alle dieren oraal gechallengeerd met CP, waarna evt. klinische symptomen voor anaphylaxie worden gevolgd. Dertig minuten na orale challenge wordt serum verzameld (via orbita) voor het meten van mestcel-degranulatie in het bloed. Op dag 31 worden de dieren gedood (verbloeden dmv orbita-punctie onder CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> - anesthesie) en worden bloed (serum), milt, GALT (gut associated lymphoid tissue), faeces, colon en ileum verzameld voor meten van verscheidene parameters, zoals hierboven beschreven.

Tijdschema studie:



**CP: crushed peanuts**

**CT: cholera toxine**

**PE: peanut extract**

**ITH: immediate type hypersensitivity**

**MMCP-1: mouse mast cell protease-1**

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	PBS + sensitisatie	- lichaamsgewicht dag -14 en dag 31 (necropsie) - serum via staart op dag -14 (of eerder), 15, 31 - oraal PBS (300 µl) d.m.v. gavage 3x per week van dag -14 tot aan necropsie dag 31 (20x) - oraal CP + CT (300 µl) d.m.v. gavage op dagen 0, 1, 2, 10, 17 en 24 - s.c. 10 µl pindaextract inspuiten in oor (controle oor met PBS) voor oorzwelling meting (DTH) - oraal CP challenge (400 µl) op dag 30 - serum verzamelen via orbita (30' na oraal challenge) - euthanasie (dag 31): CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> anesthesie, vervolgens verbloeden d.m.v. orbita-punctie.	8	♀
2	L. salivarius + sensitisatie	idem als groep A, behalve: 3x per week probiotic B behandeling (i.p.v. PBS zoals in groep A). Dosering: 10 <sup>9</sup> CFU/dier/dosis	8	♀
3	WCFS-1 + sensitisatie	idem als groep A, behalve: 3x per week probiotic C behandeling (i.p.v. PBS zoals in groep A). Dosering: 10 <sup>9</sup> CFU/dier/dosis	8	♀
4	WCFS dsl mutant + sensitisatie	idem als groep A, behalve: 3x per week probiotic D behandeling (i.p.v. PBS zoals in groep A). Dosering: 10 <sup>9</sup> CFU/dier/dosis	8	♀
5	PBS zonder sensitisatie	idem als groep A, behalve: - oraal PBS (300 µl) d.m.v. gavage op dagen 0, 1, 2, 10, 17 en 24 (i.p.v. oraal CP + CT zoals in groep A).	8	♀

NB. De gekozen probiotica stammen zijn stammen waarvan gebleken is dat zij immunomodulerende eigenschappen bezitten (gegevens vanuit in vitro testen) die interessant zijn om in een in vivo allergie model nader te onderzoeken.

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 de studie worden 8 dieren/groep gebruikt. Aangezien er vele parameters bekeken worden, met elk zijn biologische spreiding, is na overleg met het IRAS, waar ervaring is met dit soort studies), besloten te kiezen voor 8 dieren/groep (dus totaal 40 dieren). Op dit aantal zullen 4 reserve dieren worden aangekocht.

**PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING**

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

Vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen. Deze dieren zijn gevoelig voor het induceren van pinda-allergie. Er is gekozen voor vrouwelijke dieren omdat in sensibilisatie gebleken is dat vrouwtjes hogere antilichaam titers geven dan mannetjes.

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

- Alle dieren hebben ad libitum toegang tot voer en water
- Groepshuisvesting van 5 dieren in macrolon bakken met zaagsel

**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) <sup>1</sup>	Aantal dieren <sup>2</sup>	(be)handeling en effecten <sup>3</sup>	Tijdsduur of frequentie <sup>4</sup>	Verwachte mate van ongerief <sup>5</sup>
<u>1-5</u>	40	bloed verzamelen via staart (ca. 100 µl)	3x	2
<u>1-4</u>	40	orale dosering CP (+ CT) d.m.v. gavage m.a.g. sensibilisatie	7x	2*
<u>1-5</u>	40	orale dosering probiotica d.m.v. gavage	20x**	3
<u>1-5</u>	40	s.c. in oor	1x	2
<u>1-5</u>	40	meten oordikte	1x	1
<u>1-5</u>	40	bloed via orbita onder O2/CO2	1x	2
<u>1-5</u>	40	euthanasie	1x	1

\* Het ongerief van de sensibilisatie als zodanig is gering. Alleen in geval van allergische sensibilisatie kunnen bij orale challenges klinische symptomen worden waargenomen zoals tijdelijke (ongeveer 1 uur) verhoogde permeabiliteit van de darm (wordt ook gemeten via MMCP-1 in serum). Ongerief score hiervoor wordt geschat op gering/matig.

\*\* De dieren worden 3x per week gedoseerd met probiotica, vanaf dag -14 tot aan dag 31 (sectie). Aangezien het idee is dat de probiotica waarschijnlijk tijdelijk in het lumen van de darm aanwezig zullen zijn, en slechts met mate te darmen zullen gaan repopuleren, is om het 'subtiële' effect van de probiotica op allergie-ontwikkeling op te pikken, een frequente dosering nodig.

- 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) <sup>1</sup>	Aantal dieren <sup>2</sup>	Totaal ongerief <sup>6</sup>
Main groepen 1-5	40	3

- 18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?**  
**Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.**

Nauwkeurig bijhouden van de klinische verschijnselen en ingrijpen bij ernstig ongerief

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

Complicaties worden niet voorzien. Echter als de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de gavages dan zullen de dieren vroegtijdig worden gedood

- 20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?**

- Er is een kans dat na orale challenge de dieren klinische verschijnselen van anafylactische shock vertonen. Echter, aangezien met een zelfde protocol van sensitisatie er al veel ervaring is opgedaan op het IRAS (samenwerking) en inmiddels ook op TNO, en het daar nooit gezien wordt, wordt deze kans klein geacht.
- Er is een kans dat door de veelvuldige gavage er irritatie/beschadiging ontstaat in de slokdarm of dat er foutief wordt gedoseerd (bv in luchtpijp). Echter, aangezien deze techniek door ervaren en kundige mensen wordt uitgevoerd, worden deze risico's klein geacht.
- Er bestaat het risico dat door de s.c. inspuiten van het oor, er een laesie ontstaat. Echter aangezien er met een klein volume (10 µl) gespoten wordt, is deze kans klein
- Er is een kleine kans dat door de bloedafname via de orbita er een ooglaesie ontstaat.

#### 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:**

Het aantonen van de invloed van probiotica op het immuunsysteem, vergt een volledig functioneel immuunsysteem en kan derhalve alleen in vivo uitgevoerd worden.

**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.:

x zo nee; waarom niet: Doel van de studie kan alleen bereikt worden met een intact immuunsysteem

## 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?**

**Ter voorkoming van verwarring:** Er is sprake van 2 type 'challenges' in deze studie:

- alle dieren krijgen een orale challenge met vermalen pinda, waarna er gekeken wordt naar anaphylactische reacties en er wordt serum afgenomen
- alle dieren krijgen een s.c. injectie in het oor met het allergeen (pinda-extract) waarna gekeken wordt of er een oorzwellling optreed na verloop van tijd.

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

CP: crushed peanuts

CT: cholera toxine

PE: peanut extract

ITH: immediate type hypersensitivity

MMCP-1: mouse mast cell protease-

CFU: colony forming unit

onderzoeker

Management

datum:

datum:

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