



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	3.4.4.1	Longfibrose in muis of rat

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van longfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het bleomycine-geïnduceerde longfibrosemodel in muis of rat. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van longfibrose.

Om longfibrose te induceren krijgen de dieren op dag 0 onder een isofluraan roesje oropharyngeaal (op de stembanden) een bleomycine oplossing gedruppeld. Uit studies met als doel verbetering van de modellen is gebleken dat deze wijze van toediening minder ongerief veroorzaakt dan intratracheale toediening, terwijl de verdeling van de bleomycine over de longen homogener is waardoor het model beter reproduceerbaar en minder variabel qua ziektelast is geworden.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur 21 dagen, maar indien we het model chronisch laten verlopen zal de totale studieduur met 3 weken worden verlengd tot 42 dagen. De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.

- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapieën ziet er als volgt uit:

Voorbeeld long fibrose studie - testen van een compound:

days:						0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Group	Induction	Treatment	Route	dose	n																							
1	PBS	Controle vehikel	PO;QD	--	7											↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
2	Bleomycine	Controle vehikel	PO;QD	--	12											↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
3	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	0.3 mg/kg	12											↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
4	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	1 mg/kg	12											↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
5	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	3 mg/kg	12											↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
Fibrose inductie (OP bleomycine)						x																						
lichaamsgewicht (3x per week)						x	x	x						x	x	x					x	x	x					
D2O administration (IP bolus)														x														
D2O administration (in drink water)														x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Euthanasie + isolatie plasma & long weefsels																											x	

Een voorbeeld van een studie design voor het ontwikkelen van een meer chronisch longfibrose model:

Voorbeeld long fibrose studie - model ontwikkeling:

days:			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35				
Group	Induction	n																																								
1	PBS	10	x																																							
2	1x Bleomycine	15	x																																							
3	2x Bleomycine	15	x					x																																		
4	3x Bleomycine	15	x					x									x																									
Fibrose inductie (OP PBS or bleomycine)			x					x								x																										
lichaamsgewicht (3x per week)			x	x	x			x	x	x						x	x	x						x	x	x					x	x	x									
Euthanasie (3 weken na laatste inductie) + isolatie plasma & weefsels																																								x		

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de long m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de long als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de longen, bepalingen in long lavage vloeistof en/of serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeuterend water (D₂O) inbouw, etc.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

In de muis en rat wordt longfibrose geïnduceerd door bleomycine opgelost in PBS tijdens de isofluraan inhalatie narcose op de stembanden te druppelen (volume 50-200µl). Door de tong goed te fixeren en de neus dicht te houden wordt het slikreflex onderdrukt en het dieper inademen gestimuleerd (=oropharyngeaal methode). Gedurende de eerste 9-10 dagen na bleomycine inductie neemt het lichaamsgewicht langzaam af tot ca 85% van het startgewicht (ontstekingsfase). Na deze periode herstelt het gewicht zich weer tot het startgewicht.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profy lactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal drie weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intraperitoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).
- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een µCT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine

- euthanasie methode (bv mbv gradual fill CO₂ of isofluraan of conform een andere geaccepteerde methode uit richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV.) waarna isolatie van bloed, longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de bleomycine controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld: gebaseerd op een power analyse met $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen van 45% is een groepsgrootte van 13 dieren noodzakelijk (als alle groepen met elkaar vergeleken worden).

We houden er rekening mee dat per groep 1 tot 2 dieren voortijdig uit experiment moeten worden gehaald door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan de longfibrose ontwikkeling. Dit brengt de groepsgrootte naar 15 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (saline geïnduceerde en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk, te weten 6-8.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Voor het bleomycine-geïnduceerde longfibrose muismodel worden voornamelijk mannelijke C57BL/6J muizen gebruikt in leeftijd van 8-12 weken oud. Vrouwelijke C57Bl/6J muizen ontwikkelen minder longfibrose bij dezelfde bleomycine dosis dan mannelijke dieren (uit eigen studies en discussies met partners bekend). Er wordt momenteel onderzocht of de mate van longfibrose in vrouwen verhoogd kan worden door een hogere dosis bleomycine zonder dat dit tot toegenomen sterfte leidt.

Het rat model is in vrouwelijke Wistar ratten (8-10 weken oud) gevalideerd. Indien de voorkeur naar mannetjes uit gaat, zal dit model eerst verder in mannen gevalideerd moeten worden. De meeste studies zullen in de muis worden uitgevoerd. Redenen om voor het ratmodel te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. Pk studies is in rat uitgevoerd).

Indien een andere muis of rat stam nodig is zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten

effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal longfibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat longfibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een studie omvat 60-100 ratten per studie, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging:

De medicijnen die in onze longfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo hebben we in het verleden de fibrose inductie al gewijzigd van intra-tracheaal naar oropharyngeaal. Hierdoor werd de variatie van de uitleesparameters verminderd en kon de groepsgrootte verkleind worden. Verder hebben we voor dit model uitgebreide mRNA datasets beschikbaar waardoor tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheidstoestand gecontroleerd. Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te beperken, zal de inductie van longfibrose onder anesthesie plaatsvinden. Verder worden alle werkzaamheden per studie door een gering aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectievloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een osmotisch pompje onder de huid of in de buik, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%), slecht reageren op prikkels en/of ademhalingsproblemen hebben (zie J).
De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, gecontamineerd beddingmateriaal of de bleomycine oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t. dit is geen wettelijk vereist onderzoek

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Voor het induceren van longfibrose zullen de dieren onder een roesje van isofluraan gebracht worden, dit is om te zorgen dat de dieren stilliggen en goed de bleomycine oplossing zullen inademen.
Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal wordt uitgevoerd onder een pre- en postoperatief pijnstillingsregiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

nvt

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

nvt

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het longfibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de longen zullen ontwikkelen.

Doordat bleomycine schade aanbrengt aan het longepitheel zal hier op lokale plekken ontsteking plaatsvinden, vooral in de eerste 7 dagen na toediening. Immune cellen die naar de ontsteking toe migreren proberen de schade te herstellen. Echter, er zal ook functioneel longweefsel verloren gaan (hier ontstaan fibrosehaarden). Doordat het longweefsel deels niet meer functioneel is, kunnen de dieren het benauwd krijgen. De mate van het ontwikkelen van de fibrosehaarden en de daarmee gepaarde benauwdheid varieert tussen de dieren. Sommige dieren ontwikkelen meer fibrose dan anderen. Daarom hebben we een scoresysteem opgesteld waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden. Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. De dieren worden drie keer per week beoordeeld op lichaamsgewicht. Dagelijkse controle van lichaamsgewicht en algehele gezondheidstoestand vindt plaats bij dieren die gewicht verliezen. In de eerste 8-10 dagen na de inductie van de ziekte (ontstekingsfase in de longen) vallen de dieren allemaal een beetje af (5-10%). Sommige dieren vallen echter in deze periode veel meer af. Als het gewicht van deze dieren in de eerste 10 dagen van de studie met 25% afneemt hebben we in het verleden gezien dat er in deze dieren geen verbetering meer zal optreden. We besluiten dan ook om dan het humane eindpunt uit te oefenen.

Treedt het gewichtsverlies pas na dag 7, en meer geleidelijk op, dan weten we dat het dier zich zal stabiliseren en dat we de dieren in experiment kunnen laten.

Als naast het gewichtsverlies de dieren ook aanhoudend trillen, niet reageren op prikkels, ademhalingsproblemen hebben, of een vacht met opstaande haren dan wordt ook toch overgegaan op het uitvoeren van het humane eindpunt. Hieronder staat ons humane eindpunt formulier weergegeven. Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een **score van 2 of groter** van onderstaande criteria in het experiment gesignaleerd worden:

Ongeriefcode

- A** Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)
- B** Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:
 - B1** - benauwdheid/hijgen (1)
 - B2** - speekselmoed (1)
 - B3** - minder / niet reageren op prikkels (2)
 - B4** - aanhoudend trillen (2)
 - B5** - aanhoudend stuip trekken (2)
 - B6** - zelfverminking (2)
- C** Omhoog staan van de haren (1)
- D** Abnormale houding (1)

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 5 tot 10% van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Onze negatieve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekteverschijnselen. De bleomycine-geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrosevorming vermindert. Echter, het komt voor (in 0.5-1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er meer dan matige longfibrose is ontstaan) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen. De experimentduur van onze modellen varieert van 1 tot enkele weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Enmalige oropharyngeale toediening van bleomycine onder inhalatie verdoving:	licht ongerief
Longontsteking als gevolg van de bleomycine behandeling:	matig ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Eén of meermaals afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de longen, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende long lobben. Het longweefsel moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja