



## 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](http://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
		3.4.4.2	Nierfibrose 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 nierfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe therapeutica gericht op het voorkomen van nierfibrose maken wij gebruik van het unilaterale urether obstructie (UUO)- nier fibrose of het nefrectomie model in muis of rat. In het UUO nier fibrose model wordt bij de dieren op dag 0 de ureter vlak onder de nier afgebonden. De schade aan de nier ontstaat acuut. Door deze obstructie kan de urine niet meer uit de nier weg en stapelt zich op waardoor stuwings ontstaat in de bovenliggende nier. Dit heeft als gevolg ontsteking, collageen ophoping en verwijding van de nier tubuli. Dit proces gaat heel snel en binnen een aantal dagen is de nier functie van de aangedane nier volledig verdwenen. De contralaterale nier compenseert hiervoor en neemt de functie deels over. Bij een nefrectomie wordt op dag 0 één van de nieren verwijderd om zo de druk op de contralaterale nier te vergroten. Het doel is dat in deze nier schade aan de nefronen ontstaat, deze schade ontstaat echter zeer langzaam. Dit model komt meer overeen met chronische nier schade. Om de druk op deze nier extra te vergroten en het schade proces sneller te laten verlopen kan een extra trigger worden gegeven. Dit kan bijvoorbeeld door de bloeddruk te verhogen met het hormoon angiotensine of door extra zout aan het dieet toe te voegen.

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)
- Keuze voor het model: UUO (acuut model) of nefrectomie (chronisch model)
- 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 (voor een UUO studie tussen de 7 en 14 dagen; voor een nefrectomie studie maximaal 17 weken). 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 in een preventief behandelregiem ziet er als volgt uit:

						Dag												
Groep	Inductie	Treatment	Route	Dosering	n	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	Naïve	saline	SC		7		V			V			V				V	
2	UUO	saline	SC		10		V			V			V				V	
3	UUO	Compound 1	SC	5 mg/kg	10		↓			↓			↓				↓	
4	UUO	Compound 2	SC	5 mg/kg	10		↓			↓			↓				↓	
5	UUO	Compound 3	SC	10 mg/kg	10		↓			↓			↓				↓	
Inductie (UUO)							X											
Lichaamsgewicht (eerste week dagelijks, daarna 2x per week)						x	x	x	x	x			x				x	x
s.c injectie analgesie							x	x	x	x								
Euthanasie + collectie plasma & weefsels																		†

V - vehkel; ↓ - dose administration

Een voorbeeld van een pilot studie voor het testen van de aanwezige hoeveelheid collageen in een transgene muis stam ziet er als volgt uit:

				Dag											
Groep	Inductie	strain	n	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Sham	Wild type	8												
2	Sham	Transgeen	8												
3	UUO	Wild type	8												
4	UUO	Transgeen	8												
Inductie (UUO)					X										
Lichaamsgewicht (eerste week dagelijks, daarna 2x per week)				x	x	x	x	x			x			x	x
s.c injectie analgesie					x	x	x	x							
Euthanasie + collectie plasma & weefsels															†

Primaire uitleesparameters van een nier fibrose studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de nier m.b.v. histologie en beeldanalyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de nier 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 nieren, bepalingen in serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeuterend water (D<sub>2</sub>O) 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 muis en rat wordt nier fibrose geïnduceerd door de ureter van één van de nieren (meestal in de linker nier) af te binden met twee ligaturen. Eventueel kan de nier ook volledig worden verwijderd om de druk op de contralaterale nier te vergroten. De nier arterie, nier vene en de ureter worden dan met een ligatuur afgebonden waarna de nier volledig wordt weggenomen.

De dieren worden geopereerd onder isofluraan anesthesie. Peritoneum en de huid wordt gehecht.

Pre- en postoperatief krijgen de dieren pijnstilling; deze wordt tot maximaal 4 dagen na de operatie gegeven.

Verder krijgen de dieren na de operatie extra vocht toegediend en herstellen op een warmematje.

Door de buikoperatie neemt het lichaamsgewicht de eerste 2-3 dagen af, waarna deze zich weer snel herstelt tot het startgewicht.

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

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal 10 dagen, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- eenmalige dosering versus herhaalde toediening (verschil in tijdsduur en intervallen),

- toediening van combinaties van medicijnen,
- route van 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 good practice guideline van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001).
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (eerste 4 dagen na de operatie dagelijks daarna 2 of 3x per week).
- toediening van labels/tracers via intra peritoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water D<sub>2</sub>O of BrdU).
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, urine, en nier(en) 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 (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 40%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de UUO controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Voor het uittesten van nieuwe compounds varieert het aantal dieren tussen de 10 en 15 dieren per groep. De groepsgrootte hangt af van de grootte van het gewenste detecteerbare effect (de fibrose reductie is uitleesparameter afhankelijk).

Als voorbeeld gebaseerd op een power analyse  $\alpha = 0.05$  en  $1-\beta < 0.80$  voor de detectie van een significante vermindering in collageen hoeveelheid in de nier van 40% is een groepsgrootte van 14 dieren noodzakelijk. We houden er rekening mee dat we 5-10% van de dieren per groep zullen uitvallendoor bv een complicatie na de operatie. Dit gebeurt echter zelden. Dit brengt de groepsgrootte naar 15 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de naïeve/sham controle groep verwachten, zal het aantal dieren per groep hier vaak lager uitvallen.

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 nier fibrose model kan gewerkt worden met mannelijke of vrouwelijke C57BL/6J of 129SV muizen of B/N of Fisher 344 ratten variërend in leeftijd van 6-12 weken oud. De hierboven beschreven stammen/sexes zijn al eerder door ons gebruikt en het lopende fibrose model is hierop uitgebreid gevalideerd.

De stam die nodig is voor het uitvoeren van een studie zal in het studieplan aan de IvD worden toegelicht.

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 groeps grootte 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 nier fibrose studies van 6 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 3000 geschat voor een periode van 5 jaar (6 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat fibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een gemiddelde studie omvat 80 ratten, voor een periode van 5 jaar schatten we 800 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 farmaca die in onze nier fibrose 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 worden tegenwoordig de operaties onder inhalatie anesthesie uitgevoerd zodat dieren sneller uit narcose ontwaken. Hierdoor is de uitval van dieren verminderd. Verder hebben we voor het UUO 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 buikoperatie kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd en worden de dieren gewogen. De eerste 4 dagen na de operatie krijgen ze tevens pijnstilling toegediend.

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 verminderen, krijgen de dieren ruim voor de operatie pijnstilling en zal de operatie onder inhalatie anesthesie plaats vinden. Postoperatief wordt pijnstilling twee maal

daags, 4 dagen lang gegeven. Verder worden alle werkzaamheden per studie door goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie van vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Door de operatie verliest het dier vocht dit vullen we na de operatie aan met warm 0.9% NaCl. De dieren herstellen overnacht op een warmtematje. Ook wordt voer in de kooi geplaatst zodat het dier hier makkelijk bij kan.

Bij het plaatsen van medicatie in bijvoorbeeld een osmotisch pompje onder de huid of in de buikholte, 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%) of slecht reageren op prikkels (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu.

Afvalmateriaal uit de dierstudie 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.

## 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 de UUO of nefrectomie operatie krijgen de dieren pre- en post operatief (4 dagen lang) pijnstilling via subcutane injectie met carprofen (5 mg/kg BW).

Verder wordt het buikvlies voor de incisie eerst lokaal verdoofd met 4% lidocaïne spray.

Gebleken is dat 4 dagen na de operatie de buikwond zodanig hersteld is dat de dieren geen pijnstilling meer nodig hebben. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal zal ook onder een pre- en postoperatieve pijnstilling regiem (volgens richtlijnen) worden uitgevoerd.

### 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 nier fibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de nieren ontwikkelen. De fibrose die ontstaat in de nieren veroorzaakt in de dieren geen pijn. De andere nier neemt zonder problemen de functie over. De druk in deze nier neemt toe, maar schade ontstaat heel langzaam in de tijd.

We maken gebruik van een scoresysteem 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 de eerste week na de operatie dagelijks beoordeeld op lichaamsgewicht. In de eerste 2-3 dagen na de operatie vallen de dieren allemaal af (~10%). Sommige dieren vallen echter in deze periode veel meer af door een bijkomende complicatie die zich voor kan doen na een buikoperatie. Dit komt echter zeer zelden voor.

Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt.

Om de dieren tijdens de studie goed te beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder 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 signaleerd worden:

#### **Ongeriefcode**

**A** Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)

**B** Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:

- B1** - benauwdheid/hijgen (1)
- B2** - speekselvloed (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 1 tot 5% 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 naïeve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep wordt niet geopereerd en ontwikkelt geen ziekte verschijnselen. De UUO of nefrectomie dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. De compound behandelde groepen zullen naar verwachting ook matig ongerief ondervinden.

De experimentduur van het UUO model varieert van 1 tot vier 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.

Echter, het is weleens voorgekomen (in 0.1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er na de operatie een complicatie optreedt) 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.

Enmalige nier fibrose inductie : UUO obstructie of nefrectomie onder isofluraan anesthesie :	matig ongerief
Nier fibrose ontwikkeling:	licht ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Een of meermalen 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 nieren, dit meten we histologisch en biochemisch in de nier. De nier(en) 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