



## 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.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.3</td><td>Huidfibrose in muis of rat</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	3.4.4.3	Huidfibrose in muis of rat
Volgnummer	Type dierproef					
3.4.4.3	Huidfibrose 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 huidfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het bleomycine-geïnduceerde huidfibrosemodel in muis of rat. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van huidfibrose. Het huidfibrose model wordt geïnduceerd door drie keer per week lokaal (subcutaan) een bleomycine oplossing in de huid te spuiten. Een bijeffect van dit model is dat er ook milde longfibrose ontstaat. Om in dit model zowel huid als longfibrose te kunnen behandelen, willen we een nieuw model ontwikkelen (combinatie model huid en long) waarin zich naast huidfibrose ook voldoende longfibrose ontwikkelt. Dit willen we gaan opzetten door oropharyngeal (zie bijlage 1, dierexperimenten en voorbeeld hieronder) een lage dosering bleomycinedosering in de longen te geven, naast het gebruikelijke subcutane injectie regiem.

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 (de meeste studies zullen vijf weken duren, maximaal 7 weken indien er profylactisch of therapeutisch behandel regiem wordt gevolgd). 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 therapeutica in een therapeutisch behandel regime ziet er als volgt uit:

Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering	n	Days										
						-1	0	7	14	21	28	35				
1	PBS	Vehikel	PO;BID	---	7			x	=====	↑						
2	Bleomycine	Vehikel	PO;BID	---	12			x	=====	↑						
3	Bleomycine	Comp. A	PO;BID	20 mg/kg	12			x	=====	↑						
4	Bleomycine	Comp. B	PO;BID	20 mg/kg	12			x	=====	↑						
5	Bleomycine	Comp. C	PO;BID	20 mg/kg	12			x	=====	↑						
6	Bleomycine	Referentie compound	PO;BID	50 mg/kg	12			x	=====	↑						
Matchen van de dieren							x									
Fibrose inductie (sc BLM/ 3x per week)							x	x	x	x	x	x	x			
Body weight (3x per week)							x	x	x	x	x	x	x			
Behandeling ( dag 7) met compound (2x daags oraal)								x	x	x	x	x	x			
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (huid )																x

Een voorbeeld van modelontwikkeling van huid - long combinatie model:

Groep	Inductie	OP-dosering	n	Dagen																																			
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	PBS		7		x																																		
2	Bleomycine	5 IU	12		x																																		
3	Bleomycine	10 IU	12		x																																		
4	Bleomycine	15 IU	12		x																																		
Inductie (OP bleomycine in de long)					x																																		
Fibrose inductie huid (sc 3x per week)					x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x		
Body weight (3x per week)					x	x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (huid en long)																																							

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de dermis m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de huid als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse). Voor het combinatie model worden naast de huid ook in de long lobben bovenstaande parameters gekwantificeerd.

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 gedeutereerd 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 de muis wordt huid fibrose (en als bijeffect ook milde longfibrose) geïnduceerd door een bleomycine sulfaatoplossing 3 maal per week subcutaan in de geschoren huid te injecteren.

Na de eerste bleomycine injectie neemt het lichaamsgewicht iets af, maar het lichaamsgewicht herstelt zich snel. Voorafgaand aan de 1e bleomycine injecties en aan het eind van de studie zal de externe huiddikte van de muizen worden gemeten, dit gebeurt onder een isofluraan roesje.

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 (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal vijf weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- metingen van externe huiddikte (met welk interval; wekelijks of alleen bij start en eind studie)
- 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 (D<sub>2</sub>O) 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 waarna isolatie van bloed, huid en/of 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 (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 35%)
- 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  $\alpha = 0.05$  en  $1-\beta < 0.90$  voor de detectie van een significante vermindering in collageen hoeveelheid in de dermis van 35% is een groepsgrootte van 9 dieren noodzakelijk. We houden er rekening mee dat we 5-10% van de dieren per groep zullen uitvallen door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan het ziektemodel. Dit komt echter zelden voor. Dit brengt de groepsgrootte naar 10 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (PBS geïnjecteerd en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van fibrose inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk.

In dit voorbeeld wordt gerekend met een power van 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.

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.

## B. De dieren

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

Voor het bleomycine geïnduceerde-huidfibrose model wordt voornamelijk gewerkt met vrouwelijke C57BL/6J of DB/A muizen variërend in leeftijd van 6-10 weken oud. **Echter kunnen voor dit type onderzoek ook mannelijke muizen gebruikt worden, geslacht validatie staat op dit moment ingepland.**

De hierboven beschreven stammen/sexe zijn al eerder door ons gebruikt en het huidfibrose model is hierop uitgebreid gevalideerd.

De meeste studies zullen in de muis worden uitgevoerd. Echter kan dit model ook in de rat worden uitgevoerd. Reden om voor het rat model 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 bijvoorbeeld in de rat uitgevoerd).

Indien een andere muis stam nodig is voor het uitvoeren van een studie of het ontwikkelen van een nieuw model 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 huid fibrose 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 huidfibrose studies in de rat ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een gemiddelde studie omvat 100 ratten, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben.

### 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 huidfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn 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 zijn we bezig een huid-long combinatie model op te zetten, om in dit model ook meer longfibrose te genereren. We hopen zo in 1 ziektemodel het effect op twee organen te kunnen monitoren.

#### 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 gezondheid 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 verminderen, zal de externe huiddikte worden gemeten onder anesthesie. Verder worden alle werkzaamheden per studie door een klein aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie van vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een 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%), 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.

## 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.

Om eventueel naast de huidfibrose ook nog extra longfibrose te induceren zullen de dieren onder een roesje van isofluraan gebracht worden, dit is om te zorgen dat de dieren stilliggen en goed de bleomycineoplossing zullen inademen. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal

wordt uitgevoerd onder een pre- en postoperatieve pijnstilling regiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen).

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t

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

n.v.t

### 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 huidfibrose model is het de bedoeling dat er lokaal op de plek van injectie huidfibrose ontstaat. Het dier heeft hier geen last van. Echter zal zich in de dieren ook een zeer milde vorm van longfibrose ontwikkelen, waar de dieren geen last van hebben.

Om de dieren goed te monitoren maken we gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden indien ze toch onverwacht verslechteren.

Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. 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 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 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 negatieve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekte verschijnselen. 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 fibrose vorming vermindert.

Echter, het komt voor (in 0.5% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er naast huidfibrose ook 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.

Meermalen per week subcutaan injecteren van bleomycine oplossing:	licht ongerief
Huidfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine behandeling:	licht ongerief
Milde longfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine inductie:	licht-matig ongerief
Eenmalige oropharyngeale toediening van bleomycine onder inhalatie anesthesie*:	licht ongerief
Longfibrose als gevolg van extra oropharyngeale bleomycine inductie*:	matig ongerief
Meten van externe huiddikte onder inhalatie anesthesie:	licht ongerief
2 tot 3 maal per week wegen wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Eén of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

\*Dit is van toepassing op het gecombineerde huid-long model

## 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 huid en longen, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende huidbiopten en long lobben. Er moet dus weefsel 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