



## 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
	3.4.4.4	Leverfibrose 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 leverfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het CCl<sub>4</sub>-geïnduceerde leverfibrose muismodel. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van leverfibrose. Om leverfibrose te induceren krijgen de dieren vanaf dag 0 drie keer in de week, intra-peritoneaal CCl<sub>4</sub> opgelost in mineraal olie toegediend om leverschade te induceren.

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 (meestal vier weken (profy lactisch behandelregiem) of zes weken (therapeutisch behandelregiem)). 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 profylactisch testen van nieuwe therapieën ziet er als volgt uit:

					days:																			
					-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28		
Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering n																				
1	Mineral Oil	vehikel	i.p. (2x week)	- 7	x																		†	
2	CCl <sub>4</sub>	vehikel	i.p. (2x week)	- 10	x																		†	
3	CCl <sub>4</sub>	Compound -1	i.p. (2x week)	10 mg/kg 10	x																		†	
4	CCl <sub>4</sub>	Compound -2	i.p. (2x week)	25 mg/kg 10	x																		†	
5	CCl <sub>4</sub>	Compound -3	i.p. (2x week)	30 mg/kg 10	x																		†	
Body weight (3x week)					x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x		
CCl <sub>4</sub> of minerale olie injectie (i.p., 3x week)						x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x			
Behandeling (i.p., 2x week)						x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (lever)																							x	

Een voorbeeld van het leverfibrose model in de vorm van een tijdreeks voor het verkrijgen van genexpressie data en biomarker materiaal:

					days:																			
					-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28		
Groep	Inductie	D2O bolus	D2O drinkingwater	n																				
1	Mineral Oil	D0	D0-28	8	x																		†	
2	CCl <sub>4</sub>	D0	D0-D7	8	x				†															
3	CCl <sub>4</sub>	D7	D7-D14	8	x																		†	
4	CCl <sub>4</sub>	D14	D14-D21	8	x																		†	
5	CCl <sub>4</sub>	D21	D21-D28	8	x																		†	
Body weight (3x week)					x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x		
CCl <sub>4</sub> of minerale olie injectie (i.p., 3x week)						x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x			
D2O bolus (via ip injectie)						x			x				x				x							
8% D2O administration (via het drink water)						x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x	
Urine / plasma collectie						x			x				x				x					x		
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (lever)																							x	

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de lever m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de lever 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 lever lobben, bepalingen in serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse m.b.v. geïnduceerd 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 leverfibrose geïnduceerd door CCl<sub>4</sub> opgelost in minerale olie drie keer per week intra-peritoneaal in te spuiten (0.75 ml/kg; 5 ml/kg). De controlegroep krijgt alleen minerale olie geïnjecteerd. Langdurige blootstelling aan CCl<sub>4</sub> veroorzaakt in de lever cirrose en fibrose doordat het schade aan de hepatocyten veroorzaakt door de gevormde radicaal metabolieten. Hierdoor ontstaat centrolobulair milde necrose en fibrose. Na de eerste CCl<sub>4</sub> injectie neemt het lichaamsgewicht van de muizen wat af (5-10%). Dit herstelt zich in de eerste week van de studie vaak weer.

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 vier tot zes 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 intra-peritoneale 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  $\mu$ CT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine
- euthanasie methode 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 (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 20%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de CCl<sub>4</sub> 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 in de lever van 30% is een groepsgrootte van 9 dieren noodzakelijk (als alle groepen met elkaar vergeleken worden).

We houden er rekening mee dat per groep 5-10% dieren voortijdig uit experiment moeten worden gehaald door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan het i.p. inspuiten van CCl<sub>4</sub> om deze ziekte te induceren. Wanneer CCl<sub>4</sub> per ongeluk in het colon of de nier wordt gespoten, sterft het dier een paar minuten na de injectie. We passen daarom de groepsgrootte aan naar 10 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 CCl<sub>4</sub> geïnduceerde-leverfibrose muis model kan gewerkt worden met mannelijk C57BL/6J muizen variërend in leeftijd van 8-12 weken oud. Vrouwelijke C57Bl/6J muizen ontwikkelen minder leverfibrose bij dezelfde CCl<sub>4</sub> dosis dan mannelijke dieren (uit eigen studies en discussies met partners bekend).

De hierboven beschreven stam/sexen zijn al eerder door ons gebruikt en het huidige model is hierop uitgebreid gevalideerd. De meeste studies zullen in muis worden uitgevoerd. Wij krijgen in toenemende mate verzoeken om stoffen in de rat te testen. Indien dit inderdaad noodzakelijk blijkt, zal dit model eerst verder in ratten gevalideerd worden. **In deze validatie zal ook gekeken worden of de bij muizen waargenomen geslachtsafhankelijke verschillen ook in de rat op treden. Op basis hiervan zal besloten worden of beide geslachten bruikbaar zijn om voor een lever fibrose studie in te zetten.**

Redenen om voor een 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 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 leverfibrose 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 leverfibrose 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. Dit is inclusief het aantal ratten die voor validatie van het model nodig zullen zijn.

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.

Ten behoeve van het ontwikkelen en uitvoeren van een cholestatisch model voor leverfibrose waarin de pathologie primair aangrijpt op de cholangiocyten, in tegenstelling tot de hepatocyten zoals de hierboven beschreven modellen, willen we gebruik maken van de B6;Abcb4<sup>-/-</sup> muisstam. Hiervoor zullen 8 – 12 weken-oude vrouwtjes worden gebruikt, afkomstig uit de fok van het Tytgat Instituut (Amsterdam UMC, locatie AMC) te Amsterdam. Cholestase is een verzamelnaam voor aandoeningen die worden gekenmerkt door ophoping van gal in de galwegen of in de caniculli. Het gal beschadigt daarbij de omliggende cellen (cholangiocyten). Er zijn verschillende oorzaken voor het optreden van cholestase maar deze kunnen uiteindelijk allemaal leiden tot dezelfde complicaties, namelijk ontsteking van de cholangiocyten (cholangitis) en leverfibrose. Voor de behandeling van cholangitis en leverfibrose als complicaties van cholestase is nog geen therapeutische behandeling beschikbaar. ABCB4 (ATP binding cassette subfamily B member 4), ook wel bekend als MDR2 (Multidrug Resistance Protein 2), is een eiwit dat in muizen op hepatocyten tot expressie komt en betrokken is bij transport van fosfatidylcholine richting de caniculli. Het ontbreken van fosfatidylcholine verandert de samenstelling van het gal; de galzouten zijn niet verpakt in micellen en kunnen gemakkelijk het celmembraan van de cholangiocyten beschadigen. De daardoor optredende cycli van celschade leiden tot een ontstekingsreactie en zorgen voor het optreden van portale fibrose. Het humane ortholoog is ABCB4/MDR3, en specifieke polymorfismen in dit gen leiden tot progressieve familiale intrahepatische cholestase type 3 (PFIC-3), met een vergelijkbare pathologie als in de B6;Abcb4<sup>-/-</sup> muis. Het muismodel wordt ook vaak gebruikt om primaire scleroserende cholangitis (PSC) en primaire biliare cholangitis (PBC) te bestuderen. Deze drie aandoeningen zijn progressief, kunnen momenteel onvoldoende worden behandeld en leiden tot leverfalen waarvoor levertransplantatie de enige oplossing is.

Het optreden van leverschade in de B6;Abcb4<sup>-/-</sup> is spontaan en leidt tot een milde vorm van leverfibrose die zich stabiliseert in dieren van ongeveer 12 weken. De mate van leverfibrose kan mogelijk worden versterkt tot een mate die overeenkomst vertoont met de mate van leverschade zoals deze in patiënten aanwezig is door het aanbieden van een hoog vet-dieet (HFD), of andere diëten / dieetsamenstellingen.

---

### 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 leverfibrose 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. Verder willen we voor dit model uitgebreide mRNA datasets gaan verzamelen waardoor van 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 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.

Alle werkzaamheden per studie worden door een gering aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv 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%) en/of slecht reageren op externe prikkels (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, CCl<sub>4</sub> 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 Wod 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.

Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal zal ook onder een pre- en postoperatief pijnstillingsregiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen) worden uitgevoerd.

#### **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 leverfibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de lever ontwikkelen. De fibrose die ontstaat in de lever veroorzaakt zelf geen pijn in de dieren. We zien wel dat na de eerste CCl<sub>4</sub> injecties de dieren soms een geringe gewichtsafname (5-10%) laten zien. Meestal zijn de dieren binnen een week weer op het startgewicht.

Verder worden de dieren behandeld met therapeutica, dit kan het welzijn van de dieren negatief beïnvloeden. 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. Dit scoresysteem is oorspronkelijk ontwikkeld voor het beoordelen van muizen met longfibrose, maar wordt nu ook toegepast bij de overige fibrosemodellen.

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 conditie van de dieren tijdens de studie goed te kunnen 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** - speekselvoed (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 controlegroep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekteverschijnselen. De CCl<sub>4</sub> 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 soms voor (in 0.5% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief door leverfibrose) 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 minimaal 4 tot ca. 6 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.

Drie keer per week i.p. injecteren van CCl <sub>4</sub> oplossing:	matig ongerief
Lever ontsteking als gevolg van CCl <sub>4</sub> toediening:	licht ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met medicijnen/compound:	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 lever, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende lever lobben. De lever 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