



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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|---|
| 1 | Fibrose in huid, long, huid/long, lever en nier in de muis. |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 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 huid, long, lever of nierfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe therapeutica gericht op het voorkomen van fibrose maken wij gebruik van de in de wereld meest gebruikte fibrose modellen.

Niet alleen het testen van nieuwe therapeutica, maar ook het bestuderen van de rol van bepaalde pathways in het fibrose proces willen we verder kunnen onderzoeken. Pathways kunnen behalve door nieuwe therapeutica ook beïnvloed worden met si-RNA, virussen of door gebruik te maken van transgene dieren waarin bepaalde genen uit- of ingeknoekt zijn, **bijvoorbeeld de B6/MDR2^{-/-} muis waarbij het *abcb4* gen niet functioneel tot expressie komt (Smit *et al.*, Cell, 1993).**

De fibrose modellen zijn gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van huid -, long -, lever - en nierfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe therapeutica maken wij gebruik van verschillende fibrose inductie methodes.

Hieronder staat een overzicht van de verschillende fibrose modellen die wij momenteel gebruiken.

soort fibrose	Fibrose model	karakteristieken voor het model	gemiddelde studie duur
Huid	bleomycine-geïnduceerde huidfibrose model	Langdurige blootstelling aan een lage dosering van bleomycine veroorzaakt in de dermis lokaal ontsteking en collageen ophoping en in de longen een matige longontsteking en matige longfibrose ontwikkeling.	5 weken
Long	bleomycine-geïnduceerde longfibrose model	<p>Eenmalige blootstelling van een hoge dosering van bleomycine in de longen veroorzaakt DNA schade aan het longepitheel hier ontstaat lokaal ontsteking van de cellen en collageen ophoping (fibrose). Gedurende de eerste 10 dagen na bleomycine inductie in de longen neemt standaard het lichaamsgewicht 10-15% af (dit is de long ontstekingsfase).</p> <p>Na deze periode herstelt het gewicht zich meestal weer</p>	3 weken
Huid/long	bleomycine-geïnduceerde huid en longfibrose model	Langdurige blootstelling aan een lage dosering van bleomycine veroorzaakt in de dermis lokaal ontsteking en collageen ophoping en in de longen matige longfibrose. Een extra blootstelling van bleomycine in de longen zorgt dat de long fibrose van mild naar matig overgaat.	5 weken
Lever	CCl ₄ -geïnduceerde leverfibrose model.	Langdurige blootstelling aan CCl ₄ 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.	4 weken
Lever	MDR2 -/- muismodel	<p>MDR2-/- muizen brengen geen MDR2/ABCB4 tot expressie, waardoor een bepaald fosfolipide niet aan het gal wordt toegevoegd. Dit heeft tot gevolg dat galzouten de celmembranen van de galwegen beschadigd, leidend tot cycli van leverontstekingen en milde, niet progressieve leverfibrose.</p> <p>De mate van fibrose kan versterkt of verlaagd worden door de samenstelling van het dieet met betrekking tot macronutriënten te veranderen bijv. type vetzuren of % koolhydraten. Leverkanker is een complicatie die pas na een jaar in deze muizen kan optreden.</p>	10 weken
Nier	unilaterale urether obstructie (UUO)-nierfibrose model	Door afbinding van de urether ontstaat acute nierschade door stuwning van de urine naar de bovengelegen nier met ontsteking, collageen ophoping en verwijding nier tubuli tot gevolg.	10 dagen

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/klant een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een in vivo fibrose 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):

- welk geslacht (man / vrouw)
- welke stam (meestal C57Bl6/J, maar een transgene variant kan ook)
- keuze voor het model (huid, long, huid/long, lever of nier model)

- beschrijving van het te gebruiken oplosmiddel en de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentraties
- invoegen van een eventuele positieve controle of een referentie groep
- het tijdstip van behandeling (preventief of therapeutisch)
- de route van toediening (oraal, iv, sc, ip, etc)
- de frequentie van toedienen (1 of 2 maal daags of continu door voer of water)
- noodzaak voor tussentijdse bloedafnames (voor bijvoorbeeld een PK analyse)
- experimentduur (de exacte looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd)

De gemiddelde looptijd van de verschillende modellen staan in onderstaand tabel. Afhankelijk naar welk proces in het ziekteverloop gekeken wordt (ontstekingsfase, fibrose fase, afbouwfase) en of er preventief of therapeutisch behandeld gaat worden, zal een studie langer of korter kunnen uitvallen. **Voor de MDR2-/- muis hangt de looptijd van studie af van de leeftijd van de dieren. De fibrose ontwikkeling start in deze muizen 4 weken na de geboorte. We starten de studie met dieren van 8-12 weken oud. Komen de dieren jonger binnen dan zal de looptijd van de studie langer zijn.**

Huidfibrose: 35 tot 49 dagen

Longfibrose: 21 tot 42 dagen

Huid/longfibrose: 35 tot 63 dagen

Leverfibrose **dmv CCl₄**: 28 tot 42 dagen

Nierfibrose: 3 dagen tot 14 dagen

Lever fibrose in MDR2-/- muis: 10 weken, dit is afhankelijk van de leeftijd van de muizen

In grote lijnen zijn de verschillende fibrose studies het zelfde qua opzet. Een voorbeeld van een leverfibrose studie voor het testen van nieuwe therapeutica in een profylactisch behandel regiem ziet er als volgt uit:

						dagen:																		
Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering	n	-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28	
1	Minerale Olie	Vehikel	i.p (2x per week)	--	7	x																		†
2	CCl ₄	Vehikel	i.p (2x per week)	--	10	x																		†
3	CCl ₄	Behandeling-1	i.p (2x per week)	10 mg/kg	10	x																		†
4	CCl ₄	Behandeling-2	i.p (2x per week)	25 mg/kg	10	x																		†
5	CCl ₄	Behandeling-3	i.p (2x per week)	30 mg/kg	10	x																		†
Lichaamsgewicht (3x per week)						x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	
CCl ₄ of minerale olie injectie (i.p., 3x per week)						x	x			x	x	x		x	x	x		x	x					x
Behandeling (i.p. 2x per week)						x				x				x				x						x
Euthanasie + isolatie plasma & weefsel (lever)																								x

De primaire uitleesparameters voor fibrose studies zijn het bepalen van de hoeveelheid collageen in bijvoorbeeld de huid, longen, lever of nier. Dit gebeurt m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in het betreffende weefsel dit als maat voor de verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden na euthanasie van het dier zoals: nat gewicht van het betreffende weefsel (bij fibrose neemt het natgewicht toe), bepalingen in long vloeistof of serum/plasma/urine, RNA-analyses, de analyse van nieuw gevormd collageen mbv gedeutereerd 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.

Huid fibrose wordt geïnduceerd door een bleomycine sulfaatoplossing (0.1 U/muis) 3 maal per week subcutaan in de huid te injecteren. Als bijeffect ontstaat ook milde longfibrose.

In de huid en het huid/long fibrose model ontwikkelt zich door de chronische toediening van bleomycine subcutaan in de dermis ook een **milde** long fibrose dit wordt **matige** long fibrose als we ook een lage dosis bleomycine (0.01 U/muis) oropharyngeaal in de longen toe dienen.

Na de eerste bleomycine injectie in de huid neemt het lichaamsgewicht 5-10% af, maar het lichaamsgewicht herstelt zich meestal binnen 10 dagen weer. Voorafgaand aan de 1e bleomycine injectie en aan het eind van de studie zal er vaak uitwendig de huiddikte van de muizen worden gemeten, dit gebeurt onder een isofluraan roesje zodat de dieren voor de meting met de micrometer goed stil liggen.

Longfibrose wordt geïnduceerd door bleomycine (0.04 U/muis) opgelost in PBS tijdens de isofluraan inhalatie narcose op de stembanden van de muis te druppelen (volume 50 µl). Dit gebeurt door de tong uit de bek te halen en goed te fixeren, bleomycine wordt achterin de bek op de stembanden gedruppeld en daarna wordt de neus dicht gehouden. Op deze manier wordt het slikreflex onderdrukt en het diep inademen gestimuleerd (=oropharyngeaal methode).

Gedurende de eerste 10 dagen na bleomycine inductie in de longen neemt standaard het lichaamsgewicht 10-15% af (dit is de long ontstekingsfase). Na deze periode herstelt het gewicht zich meestal weer tot het startgewicht. We zien een enkele keer dat het lichaamsgewicht met meer dan 20% zakt. Uit ervaring weten we dat deze dieren weer zullen herstellen. In deze speciale gevallen zullen we indien de dieren geen andere symptomen ontwikkelen deze dieren pas euthanaseren bij 25% verlies van lichaamsgewicht. Dit zal altijd in nauw overleg met de IvD gebeuren.

Leverfibrose wordt geïnduceerd door Carbon tetrachloride (CCl₄) 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 CCl₄ veroorzaakt in de lever fibrose en eventueel cirrose doordat het schade aan de hepatocyten veroorzaakt door de vorming van vrije CCl₄ radicalen. Hierdoor ontstaat centrolobulair milde necrose en lever fibrose. Na de eerste CCl₄ injectie neemt het lichaamsgewicht van de muizen af (5-10%). Dit herstelt zich na de eerste week van de studie vaak weer.

In de MDR2^{-/-} muis is geen functionele expressie van de lipase ABCB4/MDR2 waardoor hepatocyten een bepaalde fosfolipide (fosfathidylcholine) niet richting de galgang kan transporteren. Dit heeft tot gevolg dat de galzouten niet verpakt worden in neutraliserende fosfolipide-micellen en daardoor de celmembraan van galwegepitheelcellen in de lever beschadigen. Dit veroorzaakt cycli van ontsteking, sclerotisering van de galgangen in de lever, en uiteindelijk leidt dit tot een milde, niet-progressieve vorm van leverfibrose. De mate van leverfibrose kan gemoduleerd worden door de samenstelling van macronutriënten in het dieet te veranderen. Het exacte mechanisme hierachter is nog onduidelijk. Een ernstige complicatie in het MDR2^{-/-} muismodel is het optreden van leverkanker in dieren van ongeveer 1 jaar oud. Daarom maken we geen gebruik van oude dieren.

Nierfibrose wordt in de muis geïnduceerd door de ureter van één van de nieren (meestal in de linker nier) af te binden met twee ligaturen. Pre- en postoperatief krijgen de dieren pijnstilling; deze wordt tot maximaal 7 dagen na de operatie gegeven (zie D voor pre en post behandel regiem).

De dieren worden geopereerd onder isofluraan anesthesie. Het peritoneum en de huid wordt gehecht. Verder krijgen de dieren na de operatie extra vocht toegediend en herstellen ze op een verwarmde stelling. Door de buikoperatie neemt het lichaamsgewicht in de eerste 2-3 dagen af met ongeveer 10%, meestal zijn de dieren binnen 5 tot 7 dagen na de operatie weer terug op hun startgewicht.

Afhankelijk van de onderzoeksvraag zal gevarieerd worden met onderstaande parameters:

- de start van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (zie tabel bij A, deze kan ook korter of langer zijn dan de gemiddelde studie duur)
- metingen van externe huiddikte (wekelijks of alleen bij start en eind studie)
- route van de compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- frequentie van therapeutica toediening (verschil in tijdsduur en intervallen)
- toediening van combinaties van therapeutica
- 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 is standaard, maar na een UUO operatie of bij gewichtsafname kan deze ook dagelijks plaatsvinden). Bij ernstig gewichtsverlies (>20%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen (zie lijst bij E)
- toediening van labels/tracers via intra peritoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).
- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine
- **imaging van dieren m.b.v whole-body MRI**
- euthanasie methode (mbv gradual fill CO₂ of onder isofluraan) waarna isolatie van bloed, urine, longvloeistof,

huid, longen, lever of nier weefsel zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de therapeutica 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 elke studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie aan de IvD voorgelegd ter goedkeuring.

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

Voor iedere studie aanvraag zal een separate power analyse worden uitgevoerd en aan de IvD worden voorgelegd. Om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen worden hierbij 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 het 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 zien, hoeft alleen gekeken te 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, 35 of zelfs 50%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alle groepen alléén met bijvoorbeeld de bleomycine of CCl₄ of UUU controle groep wordt vergeleken kan je beter met ongelijke groepsgroottes werken)

In onderstaande tabel staan een aantal voorbeelden van power analyses.

Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren per groep houden we er vooraf rekening mee dat er dieren mogelijk uit studie gehaald kunnen worden door bijvoorbeeld gewichtsverlies of andere klinische verschijnselen gerelateerd aan de bleomycine of CCl₄ injecties.

Studie	α	$1-\beta$	Gewenste significante reductie	n	Verwacht verlies aan dieren	Groeps grootte
A	0.05	<0.90	35%	9	5-10%	10
B	0.05	<0.80	45%	13	10-15%	16
C	0.05	<0.80	30%	9	5-10%	10
D	0.05	<0.80	40%	14	5-10%	17

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (dit zijn de sham operatie, PBS of olie geïnjecteerd en vehikel behandelde groepen) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van de fibrose inductie te bepalen, zullen in deze groep vaak minder dieren noodzakelijk zijn (7 of 8 dieren ipv 10-15 dieren).

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Dier soort	Herkomst	Levens stadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
Huid fibrose Long fibrose Huid/long fibrose Lever fibrose Nier fibrose	muis	Erkende Proefdierfokker bv Janvier of Tygat instituut	6-12 weken oud	6000	Vrouw Man Vrouw Man/vrouw Man/vrouw	MDR2-/-	C57Bl6/J (of een transgene variant bv DB/A of 129SV, MDR2-/- muizen)

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.	
Diersoort	De studies zullen in de muis uitgevoerd worden, omdat de verschillende fibrose modellen allemaal uitgebreid in de muis gevalideerd zijn.
Herkomst	C57Bl6/J worden aangekocht bij een gerenommeerde proefdierfokker. MDR2-/- muizen worden aangekocht bij het Tytgat Instituut, Amsterdam UMC.
Levensstadia	We gebruiken voor fibrose studies jongvolwassen dieren. Ze variëren meestal in de leeftijd van 6-12 weken oud. Over het algemeen zijn de dieren die gebruikt worden in de lever en long fibrose studies ouder dan de dieren gebruikt in de huid en nier fibrose studies. Dit is meer om praktische redenen, voor de uitvoering van de UUO operatie is het gemakkelijker als de dieren minder subcutaan en visceraal vet hebben (dus jonger zijn) en voor de long en lever fibrose studies weten we dat ze door de inductie met bleomycine of CCl ₄ lichaamsgewicht gaan verliezen en willen we wat zwaardere dieren (ouder) in studie hebben.
Aantal	We hebben gezien dat de markt de afgelopen jaren is teruggelopen. We verwachten in deze aanvraag dus minder dieren nodig te hebben dan de vorige CCD aanvraag. We verwachten maximaal 12 studies per jaar uit te voeren met maximaal 100 dieren per studie x 5 jaar = totaal 6.000 muizen. 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. De groeps grootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details over het aantal groepen en de groeps grootte worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.
Geslacht	Mannen en vrouwen. Voor long en lever fibrose is het model alleen gevalideerd in mannen. Voor het huid en huid/long fibrose is het model gevalideerd in vrouwen. Het nier fibrose model is zowel gevalideerd in mannen als vrouwen. Voor lever fibrose ontwikkeling in de MDR2-/- muis worden vrouwen gebruikt. Deze sexe zijn al eerder door ons gebruikt en de verschillende fibrose modellen zijn hierop uitgebreid gevalideerd. Echter kan een bepaald fibrose model ook in het andere geslacht worden uitgevoerd. Dan moet het model wel eerst opnieuw gevalideerd worden. We weten namelijk dat vrouwelijke muizen minder gevoelig zijn voor het ontwikkelen van longfibrose geïnduceerd door bleomycine en leverfibrose geïnduceerd door CCl ₄ . De juiste dosering zal dus eerst goed uitgezocht moeten worden voordat deze modellen in vrouwen uitgevoerd kunnen worden.
Genetisch gewijzigd	MDR2 -/-
Stam	C57Bl6/J, deze stam wordt het meeste door ons gebruikt en de huid, long, lever en nier fibrose modellen en zijn in deze stam uitgebreid gevalideerd. Soms worden ook MDR2 knock-out muizen gebruikt, deze stam ontwikkelt spontaan leverfibrose. Indien een andere muis stam nodig is voor het uitvoeren van een studie of het ontwikkelen van een nieuw fibrose model zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

Nee > 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.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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 nier fibrose model (ureter obstructie) krijgen de dieren 1 dag van te voren pijnstilling in het drinkwater (Rimadyl 0,067 mg/ml). Deze dosering geeft na 24 uur een even hoge bloedspiegel die correspondeert met een s.c. dosering van 1 mg/ml, 5µl/gram BW). Dit drinkwater blijft gedurende maximaal 7 dagen op de kooien staan. 10 minuten voor de start van de operatie krijgen de dieren s.c. een premedicatie van Fentanyl (0,06mg/kg) en midazolam (0.2 mg/kg) om rustig in te slapen en wakker te worden. Het uitdrogen van de oogjes wordt voorkomen door deze in te smeren met oogzalf.

Verder wordt de gehele operatie (openen/sluiten huid, openen/sluiten buikvlies, de ureter obstructie) onder isofluraan narcose (2-3% / 1.0 L/min O₂) uitgevoerd. Het buikvlies wordt voor de incisie lokaal nog extra verdoofd met een oplossing van 2% lidocaine / 0,5% bupivacaine.

Na afloop van de operatie krijgen de muizen subcutaan nog 1 ml warm fysiologische zout toegediend om het vochtverlies tijdens de operatie te reduceren. Ook krijgen ze subcutaan nog 2,5 mg/kg Rimadyl om de eerste nacht door te komen (dit omdat we hebben gezien dat ze na de operatie lang slapen en minder rimadyl drinkwater drinken). Verder herstellen de dieren overnacht op een half verwarmde stelling.

Het eventueel plaatsen van osmotische pompjes (subcutaan of intra peritoneaal) zal ook onder bovenstaande pre- en postoperatieve pijnstilling regiem worden uitgevoerd.

model:	verdoving:
huid	geen verdoving nodig voor de inductie
long	oropharyngeaal induceren gebeurt onder een isofluraan roesje
huid/long	oropharyngeaal induceren gebeurt onder een isofluraan roesje
lever	geen verdoving nodig voor de inductie
lever MDR2	ontstaat spontaan na de leeftijd van 4 weken
nier	afbinden van de ureter gebeurt onder isofluraan (2-3% / 1.0 L/min O ₂) en fentanyl (0.06 mg/kg) en midazolam (0.2 mg/kg) sedatie, in combinatie met rimadyl drinkwater (0.067 mg/ml) en 2% lidocaine /0.5% bupivacaine analgie.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Benauwdheid kan zich ontwikkelen in de huid-long en long fibrose modellen

Complicaties na een buikoperaties in het nier fibrose model.

Lichaamsgewicht verlies in alle fibrose modellen.

Behandeling met therapeutica kunnen het welzijn van de dieren negatief beïnvloeden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Benauwdheid ontstaat doordat te veel longweefsel is ontstoken of beschadigd. De mate van het ontwikkelen van de benauwdheid varieert tussen de dieren en kan soms heftiger zijn dan voorzien.

In zeldzame gevallen kan het voorkomen dat in het nier fibrose model er onbedoelde complicaties optreden na de buikoperatie.

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

Dieren krijgen voor aanvang van de studie fokvoer ipv chow dieet als voorzien wordt dat de dieren in de studie gewicht zullen verliezen (in huid/long en long fibrose studies).

Alle handelingen en operaties worden uitgevoerd door goed getraind en ervaren personeel.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In onze modellen kan het voorkomen dat door de ontsteking / fibrose die in het orgaan ontstaat sommige dieren snel achteruit gaan. De eerste tekenen hiervan zijn vaak een verlies in lichaamsgewicht. Het lichaamsgewicht monitoren we dan ook dagelijks (niet fibrose) tot drie keer per week (huid, long, lever fibrose) om dit te ondervangen. We zien soms dat dieren benauwd worden of dat er onverwacht complicaties optreden na de buikoperatie.

Verder kan het voorkomen dat de behandeling met therapeutica het welzijn van de dieren in negatieve zin kan beïnvloeden.

In het long of huid/long fibrose model kan het een enkele keer voorkomen dat het lichaamsgewicht met meer dan 20% zakt. Dit gebeurt vaak in de eerste 10-12 dagen na de inductie met bleomycine omdat dan een periode van ontsteking aanbreekt en de dieren zich niet zo lekker voelen en minder zullen eten. Uit ervaring weten we dat (de meeste) dieren weer zullen herstellen. In deze speciale gevallen zullen we, indien de dieren geen andere symptomen ontwikkelen, pas euthanaseren als 25% verlies van lichaamsgewicht wordt bereikt, zodat ze wat meer de tijd krijgen om te herstellen. Het gaat meestal over een periode van 3 dagen dat de dieren tussen de 20-25% af zijn gevallen, maar de lengte van deze periode zal altijd in nauw overleg met de IvD worden afgesproken.

Aangezien dieren door een operatie of door longontsteking in de initiatie fase 10-15% gewicht zullen verliezen. Na deze ontstekingsperiode van 7-10 dagen) moet wel herstel optreden van het gewicht.

Om het welzijn van de dieren zo goed mogelijk te monitoren maken we gebruik van onderstaand 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 toegepast bij alle fibrose modellen.

Bij een score of combinatie van scores gelijk of groter dan 2 wordt het dier geëuthanaseerd*.

o Aanzienlijke afname (>20%) van het lichaamsgewicht (2)*.

o Abnormaal gedrag, bijvoorbeeld:

o Kortademig/hijgen (1)

o Benauwdheid (2)

o Salivatie (speekselvloed) (1)

o Niet reageren op prikkels (2)

o Aanhoudend (t)rillen (tremors) (2)

o Aanhoudend stuiptrekken (convulsies) (2)

o Zelfverminking (2)

o Lichte pilo erectie (opzetten van de haren) (1)

o Zware pilo erectie (opzetten van de haren) (2)

o Abnormale houding (1)

* Voor de bleomycine longfibrose modellen mag er gedurende max 3 dagen meer dan 20% gewichtsafname optreden (is dan ernstig ongerief), maar nooit meer dan 25% gewichtsafname en alleen na toestemming van de IVD. Er zijn dan ook geen andere afwijkingen bij dit dier.

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

Uit historische studie data weten we dat in huid, nier en lever fibrose studies maximaal 5 % en in long fibrose studies maximaal 5-10% van de dieren voortijdig uit studie kan worden genomen omdat het ongerief **over zal gaan van matig naar ernstig**.

In 0.1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er bijvoorbeeld na de operatie een complicatie optreedt en de dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Een aantal muizen (uit de negatieve controle groep) zullen geen ziekte verschijnselen ontwikkelen, Omdat ze wel het inductie proces ondergaan en PBS/ minerale olie geïnduceerd krijgen wordt het cumulatief ongerief toch op matig ingeschat.

De fibrose geïnduceerde groepen van de verschillende modellen zullen **maximaal een matig ongerief** ondervinden. In het longfibrose model zullen bij maximaal 5% van de dieren ernstige ademhalingsproblemen/ benauwdheid en/of gewichtsafname van meer dan 20% (maar niet meer dan 25%) plaatsvinden. Dit zullen we als ernstig ongerief classificeren. We verwachten maximaal 500 dieren voor de longfibrose studies te zullen inzetten. Het maximaal aantal dieren met ernstig ongerief in dit project is dan 25 dieren

De met therapeutica behandelde groepen zullen naar verwachting **lichte tot matige ziektelast** ondervinden.

De experimentduur van onze modellen varieert van één tot enkele weken waarin de dieren maximaal een **matig ongerief** van de behandeling zullen ondervinden.

Studie	Diersoort / stam	Ernst (cumulatief)	Ongerief (de som van de volgende handelingen)
huid fibrose	Muis, C57Bl/6	100% matig	3x per week subcutaan injecteren van PBS of bleomycine oplossing Huidfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine behandeling Milde/matige longfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine inductie Meten van externe huiddikte onder inhalatie anesthesie
long fibrose	Muis, C57Bl/6	95% matig 5% ernstig	Eenmalige oropharyngeale toediening van PBS of bleomycine onder inhalatie verdoving Longontsteking als gevolg van de bleomycine behandeling
huid/long fibrose	Muis, C57Bl/6	100% matig	3x per week subcutaan injecteren van PBS of bleomycine oplossing Huidfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine behandeling Milde/matige longfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine inductie Eenmalige oropharyngeale toediening van bleomycine onder inhalatie anesthesie Longfibrose als gevolg van extra oropharyngeale bleomycine inductie Meten van externe huiddikte onder inhalatie anesthesie
lever fibrose	Muis, C57Bl/6	100% matig	Drie keer per week i.p. injecteren van olie of CCl4 oplossing Lever ontsteking als gevolg van CCl4 toediening
lever ontsteking/fibrose	Muis: MDR2 -/-	100% matig	Spontane leverfibrose
nier fibrose	Muis, C57Bl/6	100% matig	Eenmalige nier fibrose inductie : sham of UUO obstructie onder isofluraan anesthesie Nier fibrose ontwikkeling
Handelingen die voor alle fibrose studies gelden	Muis, C57Bl/6	100% matig	Dagelijks/wekelijks wegen licht ongerief Behandeling met therapeutica (maximaal 2x daags) max matig ongerief Eén of meermalen afnemen van bloed licht ongerief Een of meermalen afnemen van spoturine licht ongerief Injectie met tracer stof licht ongerief Imaging licht ongerief Sedatie licht ongerief Euthanasie licht ongerief
Alle studies	Muis	0,42% ernstig (n=25), 99,58% matig (n=5975)	

G. 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 therapeutica die in onze fibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de klant plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van <i>in vivo</i> studies door <i>in vitro/ex vivo</i> efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, wordt preklinisch testen in dieren helaas nog als essentieel gezien en is geen vervanging mogelijk.
Vermindering	Uit de huid, long, lever en nier fibrose modellen hebben we uitgebreide mRNA datasets beschikbaar waardoor van tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor het betreffende model. Door optimalisaties van de modellen proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Met het huid-long fibrose model kunnen we in 1 ziektemodel het effect op twee organen monitoren. We proberen ook de variatie van de uitleesparameters te verminderen zodat we de groepsgroottes kunnen verkleinen.

Verfijning	<p>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.</p> <p>De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. In de nier fibrose studies kan de buikoperatie een nadelig effect hebben op het welzijn. In alle studies wordt dan ook dagelijks de algehele gezondheid gecontroleerd en in de nier fibrose studies worden de dieren ook nog dagelijks gewogen. Tijdens de eerste 7 dagen na de operatie hebben deze dieren ook pijnstilling in het drinkwater. Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.</p>
------------	---

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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 op) ernstig ongerief?

Nee

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

I. Herhaling

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

Bij onze afdeling worden geen wettelijk vereiste experimenten uitgevoerd.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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 K.

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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen (fibrose) gevormd in de huid, longen, lever of nier dit meten we histologisch en biochemisch in huidbiopten, long, lever of in de nier.
Dit weefsel moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Dieren worden gedood mbv gradual fill CO₂ of onder diepe isofluraan anesthesie waarna bloed via een hartpunctie wordt afgenomen of dieren worden geperfundeed onder diepe isofluraan anesthesie waarna weefsels worden geïsoleerd.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.