

CODE OF PRACTICE
DIERPROEVEN IN HET KANKERONDERZOEK

Inspectie W&V
Zutphen/Den Haag, juli 1999

INHOUDSOPGAVE

1.	Inleiding	3
2.	Code of Practice	5
3.	Ongerief	7
4.	Verantwoorde eindpunten	10
5.	Controle van dieren	12
6.	Diermodellen	14
7.	Te raadplegen literatuur	15
	Bijlage 1 Model werkprotocol	18
	Bijlage 2 Sleutelsignalen voor ongerief bij muis en rat	19
	Bijlage 3 FELASA Working Group on Pain and Distress (1994): sleutelsignalen onderverdeeld naar mate van ongerief	21
	Bijlage 4 Jones (1998) - Guidance on Severity Limits	22
	Bijlage 5 Voorbeeld van een experiment-specifieke scoringslijst	24

1. INLEIDING

Ten behoeve van het kankeronderzoek worden in Nederland jaarlijks \pm 100.000 dieren gebruikt. Dit is \pm 13% van het totaal aantal jaarlijks gebruikte proefdieren. Binnen enkele onderzoeksinstellingen is dit percentage aanzienlijk hoger en varieert het van 25% tot zelfs 100%. Het betreft voor de overgrote meerderheid muizen en ratten. In 63% van de gevallen is sprake van matig tot ernstig ongerief (Zo doende 1994, 1995, 1996, 1997).

Men kan drie categorieën van dierexperimenteel kankeronderzoek onderscheiden.

1. Fundamenteel onderzoek: onderzoek op basis van basaal wetenschappelijke vraagstellingen. Het gaat hierbij vaak om mechanistisch onderzoek.
2. Klinisch-gericht onderzoek: onderzoek naar therapeutische effecten van mogelijk klinisch toepasbare therapeutica (cytostatica/bestraling/immunotherapie);
3. Veiligheidsonderzoek: onderzoek naar de mogelijke carcinogeniteit van stoffen in het kader van risicoschatting en normstelling.

Tijdens een inventariserend onderzoek dat de Inspectie in 1995 uitvoerde naar de aard en omvang van dierproeven in het kankeronderzoek, werd geconstateerd dat instellingen verschillende criteria hanteren met betrekking tot onder meer:

- maximum aanvaardbare tumormassa;
- het eindpunt van de dierproef;
- pijnbestrijding;
- observatie van de dieren.

In de afgelopen 10 jaar heeft de Veterinaire Inspectie met betrekking tot andere onderzoeksgebieden 4 *Codes of Practice* opgesteld. Gezien bovenstaande constatering achtte de Inspectie het gewenst na te gaan of een *Code of Practice* met betrekking tot dierproeven in het kankeronderzoek zinvol zou kunnen zijn en zo ja, welke aspecten minimaal in een dergelijke *Code of Practice* zouden moeten worden opgenomen. Een *Code of Practice* bevat door deskundigen geaccepteerde richtlijnen, die moeten leiden tot een verantwoord proefdiergebruik (zowel wetenschappelijk als ten aanzien van het welzijn van het dier) binnen een gegeven onderzoeksgebied. Dergelijke *Codes* kunnen een belangrijk instrument zijn voor onderzoekers, proefdierdeskundigen, leden van Dierexperimentencommissies, personen die proefdieren behandelen en medewerkers van de Inspectie.

In het Verenigd Koninkrijk (UK) had men reeds 10 jaar ervaring met een *Code* voor kankeronderzoek: in 1988 was door de *United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research* (UKCCCR) de *Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia* uitgebracht. In de UK zijn deze richtlijnen breed geaccepteerd. Ook in diverse andere landen worden deze richtlijnen gebruikt. De Inspectie in de UK hanteert deze richtlijnen bij het beoordelen van onderzoeksplannen. In 1997 is een geactualiseerde versie van dit document uitgebracht (Workman et al., 1998).

Het is van essentieel belang dat bij het opzetten van een dergelijke *Code of Practice* deskundigen vanuit het betrokken onderzoeksgebied worden betrokken. Een *Code of Practice* weerspiegelt het algemeen aanvaarde inzicht onder deskundigen op een bepaald vakgebied en is daarmee per definitie tijdgebonden. Wetenschappelijke ontwikkelingen kunnen er na verloop van tijd toe leiden dat een *Code of Practice* moet worden bijgesteld.

De Werkgroep dierproeven in het kankeronderzoek

In maart 1998 heeft de Veterinaire Hoofdinspectie de Werkgroep dierproeven in het kankeronderzoek (WDK) ingesteld. De taak van deze werkgroep was het opstellen van een *Code of Practice* met betrekking tot dierproeven in het kankeronderzoek. Alhoewel haar oorspronkelijke taak met het produceren van de voorliggende *Code of Practice* is afgerond, zal de WDK niet worden opgeheven. De WDK zal in de toekomst blijven voortbestaan als een werkgroep die kan worden geconsulteerd zowel door de Inspectie als door onderzoekers, proefdierdeskundigen en dierexperimentencommissies.

De WDK bestaat uit de volgende personen:

- dr. R. ten Berg,
Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam;
- ing. R.M.P. Brandt,
Academisch Ziekenhuis Leiden, Afd. Immunohaematologie & Bloedbank, Sectie Tumorimmunologie, Leiden;
- dr. G.J. Peters,
Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, Afd. Geneeskundige Oncologie, Amsterdam;
- dr. G.J. van Steenbrugge,
Erasmus Universiteit Rotterdam, Afd. Experimentele Urologie, Rotterdam;
- drs. P. Dortant,
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Laboratorium voor Pathologie en Immunologie, Bilthoven;
- drs. W.A. de Leeuw,
Inspectie Gezondheidsbescherming, Waren en Veterinaire Zaken, Afdeling Signalering Veterinaire Producten, Zutphen.

Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek

De *Code* bevat een aantal door deskundigen aanvaarde uitgangspunten die moeten worden gehanteerd, wanneer dierproeven worden verricht waarbij zich in (een deel van) de betrokken dieren tumoren ontwikkelen. Dit kan betrekking hebben op diermodellen waarbij spontaan tumoren ontstaan (hierbij moet ook worden gedacht aan transgene en knockout dieren), en op diermodellen waarbij tumoren worden geïnduceerd via bijvoorbeeld transplantatie, bestraling of toediening van carcinogene stoffen. Uiteraard is de *Code* niet alles omvattend en zullen er vraagstellingen zijn waarbij de *Code* niet volledig kan worden gevolgd. Als wordt afgeweken van de *Code* moet dit echter expliciet worden beargumenteerd in het onderzoeksplan dat ter beoordeling wordt voorgelegd aan de dierexperimentencommissie.

De *Code* bevat, ingedeeld naar enkele aandachtsgebieden, een aantal richtlijnen. In enkele toelichtende hoofdstukken en bijlagen wordt nader aandacht besteed aan herkenning van ongerief, verantwoorde eindpunten en controle van dieren. Tot slot is een literatuurlijst toegevoegd.

Als u wilt reageren op de *Code* of als u de WDK wilt consulteren, kunt u zich wenden tot de Inspectie. Het contactadres is:

Inspectie Gezondheidsbescherming, Waren en Veterinaire Zaken (Inspectie W&V)
Regio Oost, Afdeling Signalering Veterinaire Producten
De Stoven 22
7206 AX ZUTPHEN
tel. 0575 588100/ fax 0575 588200

2. CODE OF PRACTICE

Algemene overwegingen

- * De onderzoeker die de opzet van een dierproef bepaalt, moet zich er vooraf van vergewissen dat het niet mogelijk is het gewenste doel zonder een dierproef te bereiken of met een dierproef waarbij minder dieren worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend (Wet op de dierproeven, art. 10). In het onderzoeksplan moet worden aangegeven dat geen alternatief beschikbaar is.
- * *In vivo*¹ onderzoek naar de therapeutische werkzaamheid van stoffen mag slechts dan worden uitgevoerd als voorafgaande *in vitro*² of *ex vivo*³ experimenten hebben aangetoond dat deze middelen in potentie biologische activiteit hebben. Afwijken van deze regel moet expliciet worden beargumenteerd in het onderzoeksplan.

Verantwoorde eindpunten

- * Het is niet toegestaan "spontane" sterfte als beoogd eindpunt of als parameter te gebruiken. Als de proef een dergelijk eindpunt vereist, moet dit expliciet worden beargumenteerd in het onderzoeksplan dat wordt aangeboden aan de dierexperimentencommissie.
- * Het is niet toelaatbaar dat wordt gewacht met het euthanaseren van een dier totdat het in moribunde (stervende) toestand verkeert.
- * Een dier moet worden geëuthanaseerd als het meer ongerief ondergaat dan voor het doel van de proef strikt noodzakelijk is en het ongerief niet op een andere manier kan worden beperkt. In het kader van kankeronderzoek betekent dit, dat een dier moet worden geëuthanaseerd als er sprake is van één of meer van de volgende situaties.
 1. Het dier nuttigt geen water of voedsel meer.
 2. Het dier verliest in relatief korte tijd (1-2 dagen) meer dan 15% van het lichaamsgewicht of het lichaamsgewicht is meer dan 20% afgenomen ten opzichte van het eigen gewicht aan het begin van de proef.
 3. Er zijn ernstige circulatie- of ademhalingsproblemen.
Hierbij kunnen onder meer de volgende symptomen optreden: toegenomen adem- of hartfrequentie, bemoeilijkte ademhaling, koude en blauwe extremiteiten of oren, systemische oedeemvorming.
 4. Het gedrag en de voortbeweging van de dieren zijn sterk afwijkend.
Hierbij kunnen onder meer de volgende symptomen optreden: passief of hyperactief gedrag, automutilatie (zelfverminking), afwijkende spiertonus inclusief krampen.
 5. De tumor veroorzaakt ten gevolge van bijvoorbeeld de locatie, invasieve groei of ulceratie⁴, ernstige klinische verschijnselen.
 6. De tumormassa wordt te groot.
Bij de muis is de maximaal acceptabele tumormassa 10% van het normale lichaamsgewicht of 2 cm³. Voor de rat is de maximaal acceptabele tumormassa 10%, ± 40 cm³ of een doorsnede van 4,2 cm.
- 1 *in vivo*: onderzoek in een levend dier; in het kader van de WOD is dit een levend gewerveld dier
- 2 *in vitro*: onderzoek in levend weefsel of een cellijn dat/die is gekweekt buiten een levend organisme
- 3 *ex vivo*: onderzoek in levend weefsel kort nadat het is geïsoleerd uit een levend organisme
- 4 ulceratie: niet helende wond
- 7. Op basis van andere parameters kan met een hoge mate van zekerheid worden voorspeld dat het dier op korte termijn zal sterven.

8. Het eindpunt van de proef is bereikt.

Als de betreffende dieren op basis van hun gesteldheid kunnen worden hergebruikt, is dit, binnen de kaders die de Wet op de dierproeven hiervoor stelt, toegestaan.

Toezicht/controle

- * Voor ieder experiment waarbij tumor-dragende dieren zijn betrokken, dient een werkprotocol (zie bijlage 1) beschikbaar te zijn ten behoeve van alle medewerkers die betrokken zijn bij de uitvoering van de proef. In dit werkprotocol moeten ten minste vermeld zijn de kritische momenten in de proef, te verwachten verschijnselen van onge-rief, verantwoorde eindpunten en de personele verantwoordelijkheden in het kader van de proef.
- * De wijze waarop de dieren worden gecontroleerd en de resultaten van deze controles dienen op inzichtelijke wijze te worden geregistreerd. Deze gegevens moeten te allen tijde toegankelijk zijn voor de verantwoordelijke onderzoeker(s) en andere betrokken medewerkers, de proefdierdeskundige en de Inspectie.

3. ONGERIEF

Ongerief

Voor het bepalen van verantwoorde eindpunten moet men zich bewust zijn van de algemene tekenen van ongerief. Onder ongerief wordt verstaan stress, ongemak, agitatie, angst en pijn. Dit gaat gepaard met wijzigingen in de fysiologie en biochemie van het dier en kan leiden tot pathologische veranderingen. Voor het bepalen van de mate van ongerief bestaan geen objectieve criteria. Het betreft altijd een subjectief oordeel van één of meer personen. Op basis van een gedachtewisseling tussen onderzoeker, proefdierdeskundige en biotechnicus zal steeds opnieuw, met name bij nieuwe experimentele situaties, de mate van te ondervinden ongerief moeten worden geschat en zullen op basis daarvan geëigende maatregelen moeten worden genomen.

Signalen van ongerief

Met betrekking tot signalen van ongerief is onderscheid te maken in algemene sleutelsignalen van (matig tot ernstig) ongerief enerzijds en soortspecifieke en modelspecifieke signalen anderzijds.

Voorbeelden van algemene sleutelsignalen van ongerief zijn onder meer:

- gewijzigd eet- en drinkgedrag;
- afwijkingen in groei of afname van het lichaamsgewicht;
- afwijkende lichaamstemperatuur;
- gewijzigde consistentie, kleur of hoeveelheid faeces;
- gebrek aan exploratief gedrag en afzondering;
- afwijkende houding en voortbeweging;
- gewijzigde ademfrequentie en -diepte;
- afwijkende reacties op externe stimuli.

De *Werkgroep gradering ongerief bij proefdieren* beschrijft in haar eindrapportage (VHI, 1993) sleutelsignalen die specifiek zijn voor onder meer muis en rat (bijlage 2). Aangezien kankeronderzoek met proefdieren in Nederland voornamelijk wordt uitgevoerd met muizen en ratten, wordt in deze bijlagen uitsluitend aandacht besteed aan deze twee species. De *FELASA Working Group on Pain and Distress* heeft in haar eindrapport (Baumans et al., 1994) een bruikbaar schema opgenomen, waarin voor een 13-tal sleutelsignalen 3 categorieën van ongerief zijn benoemd (bijlage 3). Dit schema heeft betrekking op knaagdieren en konijnen. Een ander bruikbaar voorbeeld van een dergelijke schema is dat van Jones (1998). Hij benoemt voor 10 sleutelsignalen 3 categorieën van ongerief. Deze benadering is uitgewerkt voor muis en rat (bijlage 4).

Dergelijke schema's kunnen worden gebruikt om een scorelijst op te stellen. Hierbij kan aan de te onderscheiden maten van ongerief een bepaalde waarde worden toegekend. Het blijkt moeilijk een algemeen geldend schema te ontwikkelen. Wel is het mogelijk algemene schema's toe te spitsen op bepaalde typen van experimenten. In praktijk kan men aan de totaalscore van een lijst een kritische grens verbinden. In samenhang hiermee kan bijvoorbeeld worden bepaald dat bij overschrijden van deze grens het dier wordt geëuthanaseerd. Een voorbeeld van een experiment-specifiek scoringsstelsel is opgenomen in bijlage 5.

Voor meer informatie over symptomen en gradering van ongerief wordt verwezen naar het onderdeel "Te raadplegen literatuur".

Methoden van vermindering van ongerief

In kankeronderzoek bij dieren bestaat het ongerief veelal uit ongemak (bijv. afwijkende voortbeweging door localisatie van de tumor), angst (bijv. bij benadering, hantering en handelingen aan het dier), algehele malaise en mogelijk pijn, ontsteking, ischaemie (bloedeloosheid), diarree/obstipatie of uitvalsverschijnselen.

Ongerief kan op diverse manieren verminderd worden:

- a. Toepassing van de juiste experimentele technieken, aangepaste verzorging en huisvesting.

Deze aspecten kunnen grote invloed hebben op de mate van ongerief. Hierbij kan worden gedacht aan bijvoorbeeld de keuze van een juiste methodiek en locatie bij tumortransplantatie of -inductie, goede klinische inspectie, het waarborgen van een goede bereikbaarheid van water, voer en rust-plaats, goede verzorging van de dieren, etc. Dit zijn voorwaarden verbonden aan het opstarten van het dierexperimentele werk.

- b. Pijnbestrijding.

Hierbij moet onderscheid worden gemaakt tussen postoperatieve pijn, die direct gerelateerd is aan een operatieve ingreep, en pijn die gerelateerd is aan de tumorgroei. Aangezien postoperatieve pijn zeer nadelige effecten kan hebben op de fysiologie van het dier en dus ook op het betreffende experiment, kan men stellen dat pijnbestrijding vaak noodzaak is. Deze pijnbestrijding strekt zich uit over een periode van uren tot dagen na de ingreep.

Als de pijn niet een direct gevolg is van een operatieve ingreep, komen de volgende vragen aan de orde:

- heeft het dier pijn als gevolg van de tumor(en);
- reageert het dier dan goed op pijnbestrijding en wanneer moet men starten met medicatie;
- welke invloed heeft pijnbestrijding op het experiment?

Als het echt wenselijk is dat het dier voor het onderzoek langer in leven gelaten wordt, is verfijning van het experiment middels pijnbestrijding met name in modelstudies en therapeutische experimenten een mogelijkheid.

De meest bekende middelen voor pijnbestrijding zijn non-steroïde anti-inflammatoire drugs (-NSAID's) en opiaten. Beide groepen middelen hebben hun eigen werkingsmechanismen en bijwerkingen (Liles & Flecknell, 1992; Flecknell, 1997). Deze bepalen dan of, en zo ja welk middel, in welke dosering, toegepast kan worden. De middelen kunnen zowel systemisch als lokaal toegediend worden. Toediening via het voer of het drinkwater is veelal het eenvoudigst en ook mogelijk voor opiaten. Hierbij moet men er echter op bedacht zijn dat dieren in experiment mogelijk géén of minder water en/of voedsel tot zich nemen.

Het gebruik van pijnstillende middelen vermindert niet per definitie de mate van ongerief bij dieren met tumoren (van Loo et al., 1997). Ook is bekend dat bij 20 % van de mensen waarbij kanker gepaard gaat met pijn, conventionele pijnbestrijding geen verlichting van de pijn geeft (Hanks en Forbes, 1997). Soms kan met het gebruik van pijnstillende middelen slechts uitstel van ongerief worden bereikt. Dit kan met het oog op het doel van de proef te rechtvaardigen zijn.

Het is bekend dat pijn een negatieve invloed kan hebben op het immuunsysteem, waardoor de tumorgroei sneller kan verlopen. Pijnstilling kan dus invloed hebben op de

resultaten van het experiment.

Samenvattend moet men stellen dat er voor post-operatieve pijnbestrijding bij dieren goede mogelijkheden zijn, maar dat chronische pijnbestrijding bij proefdieren met tumoren niet in alle gevallen op effectieve wijze uitvoerbaar is. Als geen pijnbestrijding wordt toegepast, moet in het onderzoeksplan expliciet worden aangegeven waarom geen pijnbestrijding wordt toegepast.

c. Euthanasie.

Het beëindigen van ongerief kan ook door middel van euthanasie bereikt worden. Hiervoor moet uiteraard gebruik worden gemaakt van methoden die, rekening houdend met de diersoort en de omstandigheden, door deskundigen als meest geschikt worden beschouwd (Close et al., 1996 en 1997).

4. VERANTWOORDE EINDPUNTEN

De veelal gebruikte term 'humane eindpunten' is aan discussie onderhevig en wordt door velen, ook werkgroepleden, als een eufemisme beschouwd. Daarom wordt in deze notitie de term 'verantwoorde eindpunten' gehanteerd.

Definitie

Verantwoorde eindpunten zijn gekozen eindpunten in het leven van een proefdier, waarbij de dieren weliswaar ongerief ondervinden maar waarbij het ongerief bewust wordt beperkt. Het eindpunt kan zo worden gekozen dat de beoogde gegevens worden verkregen zonder dat sprake is van (langdurig) ernstig ongerief of zonder dat de moribunde (stervens-) fase optreedt. Tevens kan een dergelijk eindpunt worden gekozen als de verwachting is dat het dier na de dierproef, langere tijd ongerief ondergaat (zie ook: Wet op de dierproeven, artikel 13, 4e lid).

Motivatie voor de keuze van verantwoorde eindpunten

Algemeen uitgangspunt bij het verrichten van dierproeven is, dat het ongerief dat de betrokken dieren ondergaan zoveel mogelijk wordt beperkt. Het hanteren van verantwoorde eindpunten is een mogelijkheid hiertoe. De keuze voor verantwoorde eindpunten is gebaseerd op de aanname dat dieren die doodgaan tijdens een dierproef, lijden en dat dit lijden toeneemt naarmate het tijdstip van overlijden dichterbij komt. Deze aannames worden veelal terecht gedaan maar zijn waarschijnlijk niet in alle gevallen juist.

Voor het bepalen van verantwoorde eindpunten moet men zich bewust zijn van de algemene (klinische) tekenen van ongerief. Tevens moet men weet hebben van (klinische, biochemische, fysiologische) parameters die indicatief kunnen zijn voor een naderende moribunde fase. Hierbij moet uiteraard een afweging worden gemaakt tussen enerzijds het eventuele extra ongerief dat wordt veroorzaakt door de handelingen die noodzakelijk zijn voor het bepalen van deze parameters en anderzijds de mate van ongerief die het dier mogelijk kan worden bespaard op basis van de uitkomst van de bepaling.

De keuze van het moment waarop de dieren worden gedood, is afhankelijk van de diersoort, de mate van ongerief, het doel van de proef en eventuele wettelijke bepalingen. Als bijvoorbeeld een controle dier in een carcinogeniteitsstudie een waarneembare tumor heeft die geen ernstig ongerief veroorzaakt, wordt het niet direct geëuthanaseerd, omdat wordt gestreefd naar een overleving in de controlegroep van > 50 % na twee jaar; anders zou de studie op grond van een te geringe overleving als inadequaats beschouwd worden. Als echter bij een dier in een acute, subacute of semi-chronische studie een tumor wordt waargenomen, zal men veel sneller overgaan tot euthanasie van het betreffende dier. In alle gevallen waarin het in leven laten van een tumor dragend dier geen gerechtvaardigd doel dient, moet het dier worden geëuthanaseerd.

Daarnaast levert een "spontaan" gestorven dier over het algemeen minder biologisch relevante informatie op dan een dier dat geëuthanaseerd is vóór het stadium waarin het dier moribund geworden is. De te verzamelen monsters van geëuthanaseerde dieren zijn in betere staat en kunnen vaak beter gestructureerd verwerkt worden.

Andere parameters dan sterfte kunnen even waardevolle informatie opleveren en daarbij de dieren aanzienlijk minder ongerief bezorgen. Voorbeelden hiervan zijn het interval tussen eerste behandeling met een mogelijk carcinogene stof en eerste klinische waarneming van tumorgroei, het effect van antitumorbehandeling op de grootte van een uitwendig waarneembare tumor, histopathologische analyse van invasie en/of metastasering, klinisch-chemische en hematologische bepalingen, zoals het aantal blastcellen in leukemie-modellen.

Daarom moet de dood van een proefdier niet als beoogd eindpunt of belangrijkste parameter in een dierproef in het kader van kankeronderzoek beschouwd worden.

Keuze van het eindpunt

Uitgangspunt is dat een dier geëuthanaseerd moet worden als het meer ongerief ondergaat of dreigt te ondergaan dan voor het doel van de proef strikt noodzakelijk is en als het ongerief niet in voldoende mate kan worden beperkt.

Op basis hiervan kan worden gesteld dat een dier moet worden geëuthanaseerd als één of enkele van de volgende omstandigheden zich voordoen:

1. Er is een ernstige achteruitgang in conditie opgetreden.

Een verlies in relatief kort tijdsbestek van 1-2 dagen van meer dan 15% van het lichaamsgewicht is als ernstig ongerief op te vatten. Daarbij levert het aanhouden van proefdieren in dit stadium veelal minder biologisch relevante gegevens op.

2. De totale tumormassa is te groot geworden.

De criteria voor "te groot" zijn afhankelijk van de aard van de tumor maar in het algemeen kan worden gesteld dat tumoren niet zo groot moeten zijn, dat ze door hun massa, locatie, invasieve of ulceratieve¹ groeiwijze het normale gedrag van de dieren ernstig bemoeilijken of ernstige pathofysiologische consequenties hebben. Ulceratie kan bij subcutaan getransplanteerde tumoren als een open wond waargenomen worden. In dit geval is per definitie sprake van ernstig ongerief. Niet alle open wonden zijn ulceraties. Een goede observatie blijft noodzakelijk! Bij een niet tijdig genezen van de open wond dient het dier te worden gedood.

In zijn algemeenheid wordt gesteld dat een tumor in een muis niet groter mag zijn dan 2 cm³. Voor de rat is de maximaal acceptabele tumormassa 10%, \pm 40 cm³ of een doorsnede van 4,2 cm. Als echter cachexie² wordt waargenomen, moet het dier eerder worden geëuthanaseerd.

3. Er zijn ernstige klinische symptomen van andere aard aanwezig.

4. Het is op basis van bovengenoemde situaties of op basis van ander parameters met grote mate van zekerheid voorspelbaar dat op korte termijn de dood intreedt.

Bij het kiezen en hanteren van verantwoorde eindpunten speelt het toepassen van de juiste statistische methoden een belangrijke rol. De keuze van de juiste statistische methode is afhankelijk van het soort experiment. Het evalueren van een anti-tumor effect vereist een andere benadering dan een inventariserend onderzoek naar de biologische gevolgen van transgeniteit. Het gebruik van non-parametrische testen is in veel gevallen aan te bevelen. Bij het opzetten van de dierproef dient vastgesteld te worden welke "power"³ noodzakelijk is om de gestelde hypothese afdoende te kunnen testen (Beynen en Montfort, 1995). Hiervoor kan gebruik gemaakt worden van standaard tabellen in de handboeken. Bij twijfel moet een statisticus worden geraadpleegd.

Naast een goede statistische onderbouwing dient het onderzoeksplan ook een duidelijke omschrijving van de wetenschappelijke doelstelling te bevatten. Pas na een wetenschappelijke toetsing volgens institutionele richtlijnen kan de dierexperimentencommissie een advies geven.

¹ ulceratie: niet helende wond

² cachexie: sterk verslechterde lichaamsgesteldheid met onder meer vermagering, spieratrofie en algemene zwakte

³ power: onderscheidingsvermogen

5. CONTROLE VAN DIEREN

Met betrekking tot de controle van dieren zijn de volgende uitgangspunten van belang:

1. Alle binnen een onderzoeksinstelling aanwezige dieren moeten minimaal eenmaal daags worden gecontroleerd. Dit is een routinematige controle op calamiteiten, waarbij het niet noodzakelijk is dat de dieren in de hand worden genomen.
2. Minimaal 1x per week worden alle dieren individueel gecontroleerd.
3. Afhankelijk van de aard van het experiment kan aanvullende controle noodzakelijk zijn.

De frequentie waarmee en de wijze waarop de dieren aanvullend gecontroleerd moeten worden zijn afhankelijk van:

- de biologische eigenschappen van de tumor onder de gegeven omstandigheden;
- de gebruikte inducerende middelen en methoden;
- effecten van overige (biotechnische) handelingen;
- veranderingen in de klinische toestand van het dier.

Dit betekent dat het noodzakelijk kan zijn, dat tijdens een deel van de proef de frequentie waarmee en de wijze waarop de dieren worden gecontroleerd, worden aangepast.

Onderzoekers zijn primair verantwoordelijk voor het experiment. Zij moeten beschikbare en relevante kennis van de gebruikte tumoren, middelen en biotechnieken in voor ieder begrijpelijke bewoordingen schriftelijk (als onderdeel van het onderzoeksplan) en zo mogelijk ook mondeling overdragen aan de betrokken biotechnici, dierverzorgers of andere betrokken medewerkers. Voor ieder experiment met tumor-dragende dieren, moet een werkprotocol beschikbaar te zijn voor de medewerkers die betrokken zijn bij de uitvoering van de proef. In dit werkprotocol moeten in ieder geval worden vermeld de kritische momenten in de proef, de wijze van controleren van de dieren, te verwachten specifieke verschijnselen van ongerief, criteria voor verantwoorde eindpunten en de personele verantwoordelijkheden in het kader van de proef en de bereikbaarheid van de verantwoordelijke onderzoeker(s). Dit werkprotocol (bijlage 1) moet beschikbaar zijn tijdens de uitvoering van de controles in de dierkamers. De resultaten van deze controles en eventuele aanvullende acties (onderzoek of consultatie) moeten worden vastgelegd. Deze registratie moet zodanig zijn, dat betrokken medewerkers van de instelling en medewerkers van de Inspectie op eenvoudige wijze inzicht wordt geboden in de relevante informatie.

Alle routinematige controles moeten worden uitgevoerd door ervaren dierverzorgers of biotechnici. De aanvullende controle moet zodanig worden uitgevoerd dat:

- verschijnselen die wijzen op (naderend) ernstig ongerief tijdig worden opgemerkt;
- dieren die dezelfde dag geëuthanaseerd moeten worden of waarvoor de daarop volgende 24 uur verdere observatie of consultatie gewenst is, worden opgespoord.

Doorgaans betekent dit dat de aanvullende controle een individuele controle is.

Eventueel aanvullende observatie of onderzoek moet bij voorkeur samen met de onderzoeker plaatsvinden. Aanvullende controles worden tenminste dagelijks uitgevoerd bij te verwachten ernstig ongerief (snel of invasief (infiltrerend) groeiende tumoren en toename van de tumormassa) of significant (geschatte afname > 30%) gewijzigde voedsel- en/of wateropname.

Tijdens aanvullende controles kunnen, afhankelijk van het type onderzoek, verschillende parameters beoordeeld worden. Als de bevindingen vertaald worden in een numeriek scoringssysteem kan beter worden bepaald op welke moment de onderzoeker wordt geconsulteerd of tot euthanasie wordt overgegaan. Een voorbeeld hiervan is te vinden in bijlage 5. Hierbij moet men beseffen dat er voor ieder experiment een specifieke scoringslijst moet worden opgesteld.

6. DIERMODELLEN

Ten behoeve van het dierexperimenteel kankeronderzoek is een groot aantal diermodellen ontwikkeld. Het voert te ver om in het kader van deze *Code of Practice* en de toelichting hierop een opsomming te geven van (een deel van) de bestaande modellen en in te gaan op de (on)geschiktheid van bepaalde modellen voor de beantwoording van specifieke onderzoeksvragen. In het onderdeel "Te raadplegen literatuur" zijn enkele verwijzingen opgenomen die waardevol kunnen zijn bij de keuze of evaluatie van diermodellen.

7. TE RAADPLEGEN LITERATUUR

Ongerief

- Baumans, V., Brain, P.F., Brugère, H., Clausing, P., Jeneskog, T. and Perretta, G. (1994). Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the FELASA Working Group on Pain and Distress. *Lab.Animals.*, 28, 97-112.
- Flecknell, P.A. (1994). Refinement of animal use - assessment and alleviation of pain and distress. *Lab.Animals*, 28, 222-231.
- Flecknell, P.A. (1997). Assessment and alleviation of post-operative pain. *AWIC Newsletter*, Winter 1997/1998, 8 (3-4), 8-14.
- Hanks, G.W., and Forbes, K. (1997). Opioid responsiveness. *Acta Anaesthesiol.Scand.*, 41(1pt. 2): 154-158.
- LASA Working party. (1990). The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Lab.Animals.*, 24, 97-130.
- Liles, J.H., Flecknell, P.A. (1992). The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. *Lab.Animals*, 26, 241-255.
- van Loo, P.L.P., Everse L.A., Bernsen, M.R., Baumans, V., Hellebrekers, L.J. Kruitwagen, C.L.J.J. and den Otter, W. (1997). Analgesics in mice used in cancer research: reduction of discomfort ? *Lab.Anim.*, 31, 318-325.
- Montgomery, C.A. (1987). Control of animal pain and distress in cancer and toxicological research. *JAVMA*, 191(10). 1277-1281.
- Montgomery, C.A. (1990). Oncological and toxicological research: alleviation and control of pain and distress in laboratory animals. *Cancer.Bull.*, 42(4), 230-237.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H.M. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet.Rec.*, 116, 431-436.
- Morton, D.B. (1997). A scheme for the recognition and assessment of adverse effects in animals. In: *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Eds. Van Zutphen, L.F.M. and Balls, M., pp. 235-240. *Dev.Anim.Vet.Sci.* 27. Elsevier, Amsterdam.
- VHI (Veterinaire Hoofdinspectie). (1993). Gradering ongerief bij proefdieren. pp.38. Rijswijk.
- Wallace, J., Sanford, J., Smith, M.W., Spencer, K.V. (1990). The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Lab.Animals.*, 24, 97-130.

Modellen en technieken

- Beynen, A.C. en van Montfort, M.A.J. (1995). Ontwerp van dierproeven.
In: van Zutphen, L.F.M., Baumans V., Beynen A.C. Proefdieren en dierproeven. Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, Utrecht.
- Boven, E., Winograd B. (Eds). (1991). The nude mouse in oncology research. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London.
- Curt, G.H. (1994). The use of animal models in cancer drug discovery and development. *Stem Cells*, 12, 23-29.
- Kallman R.F. (1987). Rodent tumor models. Pergamon Press, New York.
- Kubota, T. (1994). Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: The importance of orthotopic transplantation. *J. Cell. Biochem.*, 56, 4-8.
- Lovejoy, E.A., Clarke A.R., Harrison, D.J., (1997). Animal models and the molecular pathology of cancer. *J. of Pathol.*, 181, 130-135.
- Martin, D.S., Balis, M.E., Fisher, B. et al. (1986) Role of murine tumor models in cancer treatment research. *Cancer Res.*, 46, 2189-2192.
- Redgate, E.S., Deutsch, M., Boggs, S.S. (1991). Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns. *Lab.Anim.Sci.*, 41(3), 269-273.
- Thomas, H. (1994). Oncogene Transgenic mice as therapeutic models in cancer research. *Eur. J. Cancer*, 4, 533-537.
- Twentyman, P.R., Brown, J.M., Gray, J.W. (1980) A new mouse tumour model system (RIF-1) for comparison of end-point studies. *J.Natl. Cancer Inst.*, 64, 595-604.
- Phillips, R.M., Pearce, J., Loadman, P.M., Bibby, M.C., Cooper P.A., Swaine, D.J., Double, J.A. (1998) Angiogenesis in the hollow fiber tumor model influences drug delivery to tumor cells: implications for anticancer drug screening programs., *Cancer Res.*, 58, 5263-5266.

Bestaande richtlijnen

- CCAC. (1998). Guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. pp. 29. Ottawa.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab.Animals*, 30, 293-316.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt,

W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., Warwick, C. (1997).
Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab.Animals*, 31, 1-32.

Workman, P., Twentyman, P., Balkwill, F. et al. (1998). United Kingdom Co-ordinating
Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the welfare of Animals in Experi-
mental Neoplasia (2nd edition, July 1997). *Brit.J.Cancer.*, 77, 1-10.

Algemeen

VHI (Veterinaire Hoofdinspectie) (1994; 1995; 1996; 1997). Zo doende. Jaarverslag
van de Sectie dierproeven van de Veterinair Hoofdinspectie. Rijswijk.

Relevante web(/internet)-sites:

Product safety assessment, via de product info van:
www.criver.com/

Whole mouse catalogue: www.rodentia.com/wmc/

Animals for research: www.nci.nih.gov/hpage/extra.html => developmental program =>
animals for research

Bijlage 1: Model werkprotocol

Animal Experimental Procedures code:

Nummer onderzoeksplan (dierexperimentencommissie):

Naam verantwoordelijk onderzoeker:

Nummer Vergunning VROM:

Nummer Vergunning LNV:

Titel experiment:

Datum start / (geschat) eind van experiment:

Strain(s) (constructs), aantal dieren:

Korte beschrijving van doel en aard van de handelingen:

Te verwachten klinische verschijnselen (moment van optreden):

Frequentie van controle van de dieren:

Personen die de handelingen uitvoeren (tel.nrs.):

Wat te doen in geval van ernstig zieke / dode dieren:

Gebruik gevaarlijke stoffen / voorzorgsmaatregelen:

Geschat ongerief

Aantal dieren

	1*	2	3	4	5	6
Gering frequent/langdurig						
Matig frequent/langdurig						
Ernstig frequent/langdurig						

* verwijst naar de nummers van de specifieke handelingen genoemd in de korte beschrijving van het experiment

Bijlage 2: Sleutelsignalen van ongerief

DE MUIS

Laboratoriummuizen zijn gedurende vele honderden generaties geselecteerd op uiteenlopende eigenschappen. Daardoor bestaan er belangrijke stamverschillen in gedrag en in de reactie op stressoren.

UITERLIJK Oogleden half of geheel gesloten. Ogen lijken ingevallen, ooguitvloeiing wanneer conditie verergert. Piloerectie, vacht dof en in slechte conditie, gewichtsverlies, uitdroging, verdwijnen van rugspieren. Ingevallen buik: duidt op afname in voedselopname.

ONTLASTING Defaeceren en urineren kunnen als directe reactie op stress optreden. Diarree kan leiden tot een bevulde vacht.

GEDRAG Muizen worden in toenemende mate agressief en kunnen bijten wanneer pijn of stress toeneemt. Tegenstribbelen, bijten, probeert de oorzaak van de pijn of de aangetaste plek te bijten, toegenomen activiteit. Wanneer de toestand verslechtert, worden de dieren rustig of apathisch en zonderen zich af van de groep. Uiteindelijk reageren ze niet meer op hun omgeving. Stopt met normaal eten en drinken, dier slaapt niet, poetst niet en krabt vaak. Krimpt ineen bij buikpijn. Kan aangetaste lichaamsdeel beschadigen. Optreden van stereotiep gedrag.

HOUDING Krijgt geleidelijk een gekromde, slaaphouding en gaat in een donkere hoek zitten.

LOCOMOTIE Plotseling rennen, vluchtpogingen, moeite met handhaven lichaams-houding. Wankele gang.

VOCALISATIE Piept bij geringe pijn, dit verdwijnt wanneer de pijn het vermogen om te reageren vermindert.

FYSIOLOGIE Snelle en oppervlakkige ademhaling, waarbij soms door neusuitvloeiing een snotterend geluid is te horen. Hypothermie bij verdergaande verslechtering van de conditie.

Belangrijkste kenmerken van ongerief: gewichtsverlies, bijten, piloerectie, gekromde rug, ingevallen ogen en buik, uitdroging en verminderde reflexen.

DE RAT

Ratten zijn over het algemeen tam en minder agressief tegenover soortgenoten en de mens dan muizen. Tijdens herhaalde pijnlijke of stressvolle procedures kunnen de dieren echter agressief en onhandelbaar worden.

UITERLIJK Piloerectie en doffe, slordige vacht. Soms haaruitval. Slechte huidspanning, tekenen van verlies van spieren op de rug, uitdroging en gewichtsverlies. Oogleden zijn half of helemaal gesloten, en de ogen lijken verzonken, oogafscheiding treedt vaak op en kan uiteindelijk leiden tot een rode kring rond het oog.

ONTLASTING Defaeceren en urineren kunnen optreden als onmiddellijke angst reactie, minder duidelijk bij pijn of langdurige stress. Soms komt constipatie of diarree voor.

GEDRAG Dieren zijn aanvankelijk attenter en meer agressief, maar worden later passief en reageren niet meer. Slaap in toenemende mate verstoord. Stopt met eten en drinken. Vermindert exploratief gedrag. Soms beschadiging van aangetaste lichaamsdelen.

HOUDING Neemt geleidelijk een liggende houding aan, vaak opgerold met de kop tegen de buik gedrukt. Harde, gespannen buik wanneer pijn aanwezig is in de buikholte. Scheve kop bij o.a. oorpijn.

LOCOMOTIE Op hoge poten lopen is een uiting van pijn in het abdomen.

VOCALISATIE Aanvankelijk piepen of krijsen, speciaal tijdens hanteren, geleidelijk een afname in de geluiden wanneer pijn of ongerief voortduurt, tenzij een plotselinge pijnlijke prikkel wordt ervaren.

FYSIOLOGIE Verhoogde ademhalingsfrequentie.
Hypothermie duidt op een ernstige verslechtering, bleek voorkomen kan duiden op anaemie of bloedverlies.

Belangrijkste kenmerken van ongerief: krijsen, tegenstribbelen, afweren, gewichtsverlies, piloerectie, gekromde houding, hypothermie.

**Bijlage 3: Sleutelsignalen onderverdeeld naar mate van ongerief
(FELASA Working Group on Pain and Distress, 1994)**

Mild	Moderate	Substantial
Reduced weight gain Food and water consumption 40-75% of normal for 72 h	Weight loss of up to 20% Food and water consumption less than 40% of normal for 72 h	Weight loss greater than 25% Food and water consumption less than 40% for 7 days, or anorexia (total inappetence) for 72 h
Partial piloerection	Staring coatXmarked piloerection	Staring coatXmarked piloerection- with other signs of dehydration such as skin tenting
Subdued but responsive, animal shows normal provoked patterns of behaviour Interacts with peers Hunched transiently especially after dosing	Subdued animal shows subdued behaviour patterns even when provoked Little peer interaction Hunched intermittently	Unresponsive to extraneous activity and provocation Hunched persistently ('frozen')
Transient vocalization provoked	IntermittentXvocalization when unprovoked	'Distressed'-vocalization
Oculo-nasal discharge transient (typically signs of chromorhino- dacryorrhoea in rodents)	Oculo-nasal dischargeXpersistent	Oculo-nasal dischargeXpersistent and copious
Normal respiration	Intermittent abnormal breathing	Laboured respiration
Transient tremors No convulsions No prostration	Intermittent tremors Intermittent convulsions Transient prostration (< 1h)	Persistent tremors Persistent convulsions Prolonged prostration (> 1h)
No self-mutilation	No self-mutilation	Self-mutilation

Bijlage 4a: Guidance on Severity Limits - Mouse (Jones, 1998)

		Mild	Moderate	Substantial
Body Weight	. Body Weight	. Up to 10% weight loss	. 10% - 20 % Weight loss	. >20% Weight loss
Appearance	. Posture	. Transiently hunched- especially after dosing	. Intermittently hunched	. Persistently hunched
	. Piloerection	. Partial	. Marked-staring coat	. Marked-staring coat + additional signs of unched posture, unresponsive behaviour
Clinical signs	. Respiration	. Normal	. Intermittent abnormal pattern	. Persistently laboured
	. Salivation	. Transient	. Intermittent with wetting of fur under chin	. Persistent, permanently wet fur
	. Tremors	. Transient	. Intermittent	. Continuous
	. Convulsions	. None	. Intermittent (but <10 mins duration)	. Continuous (euthanize if > 10 mins duration)
	. Prostration	. None	. Transient < 1hr	. Persistent > 1hr (euthanize if 3 hour duration)
Unprovoked behaviour	. Socialisation	. Peer interaction	. Little peer interaction	. No peer interaction
Response to stimulus	. Provoked behaviour	. Minimal charges	. Subdued - responds when stimulated (eg handling)	. Unresponsive to extraneous activity or provocation

Bijlage 4b: Guidance on Severity Limits - Rat (Jones, 1998)

		Mild	Moderate	Substantial
Body Weight (excluding transient weight loss)	. Body Weight	. Up to 10% weight loss	. 10% - 25 % Weight loss	. >25% Weight loss
	. Food/water consumption	. 40-75% for 72 hrs.	. <40% for 72 hrs.	. <40% for 7 days or anorexia >72hrs
Appearance	. Posture	. Transiently hunched-especially after dosing	. Intermittently hunched	. Persistently hunched
	. Piloerection	. Partial	. Marked-staring coat	. Marked-staring coat + additional signs of hunched posture, unresponsive behaviour
Clinical signs	. Respiration	. Normal	. Intermittent abnormal pattern	. Persistently laboured
	. Salivation	. Transient	. Intermittent with wetting of fur under chin	. Persistent, permanently wet fur
	. Tremors	. Transient	. Intermittent	. Continuous
	. Convulsions	. None	. Intermittent (but <10 mins duration)	. Continuous (euthanize if > 10 mins duration)
	. Prostration	. None	. Transient < 1hr	. Persistent > 1hr (euthanize if > 3 hour duration)
Unprovoked behaviour	. Socialisation	. Peer interaction	. Little peer interaction	. No peer interaction
	Response to stimulus	. Provoked behaviour	. Minimal charges	. Subdued - responds when stimulated (eg handling)
				. Unresponsive to extraneous activity or provocation

Bijlage 5: Voorbeeld van een experiment-specifieke scoringslijst

Het onderstaande voorbeeld is ontleend aan het rapport *AGuidelines on choosing an appropriate endpoint in animal experiments* van de Canadian Council on Animal Care (CCAC, 1998).

Het betreft een colontumormodel bij de rat. De colontumoren worden met azoxymethane geïnduceerd. De eerste vier maanden worden de dieren volgens de standaard routine procedure geobserveerd. Na vier maanden worden de dieren drie keer per week geïnspecteerd. Dit houdt onder meer in:

- Σ palpatie van het abdomen;
- Σ beoordeling van de ogen t.b.v. controle op anaemie;
- Σ test van feaces op de aanwezigheid van bloed;
- Σ beoordeling van het algemeen voorkomen en het gedrag.

Het volgende scoresysteem werd hierbij gehanteerd.

1. Lichaamsgewichtsveranderingen

<u>score</u>	<u>bevindingen</u>
0	normaal
1	< 10 % verlies
2	10-15 % verlies
3	> 20 % verlies

2. Symptomen

<u>score</u>	<u>bevindingen</u>
0	geen afwijkingen
1	bleke ogen: anaemie
2	anaemie, bloed in faeces, diarree/ kleine keutels
3	bovengenoemde symptomen + volume toename van het abdomen
4	afwijkende houding, geen poetsgedrag, haar dof/ruig

Eindpunt

- * Euthanasie als als het gewichtsverlies meer is dan 15% in vergelijking met de controle dieren .
Als om experimentele redenen de dieren niet worden geeuthanaseerd, is pijnstilling tot het eind van het experiment noodzakelijk.
- * Euthanasie van de dieren die een totale score > 4 bereiken.