



## Minder Stress, Beter Onderzoek

Tonny Lagerweij<sup>2</sup>, Arianne van Koppen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afdeling Metabolic Health Research, TNO, Leiden,

<sup>2</sup>Instantie voor Dierenwelzijn, TNO, Den Haag, contact: tonny.lagerweij@tno.nl

Tijdens de laatste Biotechnische Dagen op donderdag 11 november 2021 heeft Ab Osterhaus de DALAS-prijs voor vermindering en verfijning van dierproeven uitgereikt aan Joline Attema en Christa de Ruiter, researchanalisten bij de afdeling Metabolic Health Research (MHR) van TNO in Leiden. Ze kregen deze prijs voor het uittesten en implementeren van een scala aan verbeteringen in het door TNO ontwikkelde muismodel voor diabetisch nierfalen, een ziekte waar 12% van de Nederlandse bevolking aan lijdt. Ondanks dat er, ook binnen TNO, wordt gekeken naar proefdiervrije methoden op dit onderzoeksgebied, zijn deze alternatieven nog steeds onvoldoende toepasbaar voor complexe vraagstellingen en zijn er dus helaas nog dierproeven noodzakelijk.

Voor studies naar nierschade ten gevolge van diabetes wordt er gebruik gemaakt van de KKAY-muis van Jackson Laboratories. Deze muis is zeer gevoelig voor stress: een gevolg van deze stress is dat bij het minste of geringste huidproblemen ontstaan. Regelmatig leiden deze huidproblemen vanwege het diabetische model tot (open) wonden die heel slecht genezen. Tijdens de eerste studies was er hierdoor veel uitval van dieren waardoor uit het onderzoek geen goede conclusies konden worden getrokken. Er is daarom kritisch gekeken waar in de studie-opzet en diervoorzorging aanpassingen mogelijk waren. Het bleek dat als er op slechts een aspect in de verzorging, handelingen of experimentele procedure van de dieren een verbetering werd doorgevoerd dit onvoldoende was om uitval van dieren te voorkomen. Daarom hebben de analisten de verzorging en experimentele opzet op een aantal verschillende punten aangepakt zoals hieronder stapsgewijs weergegeven.

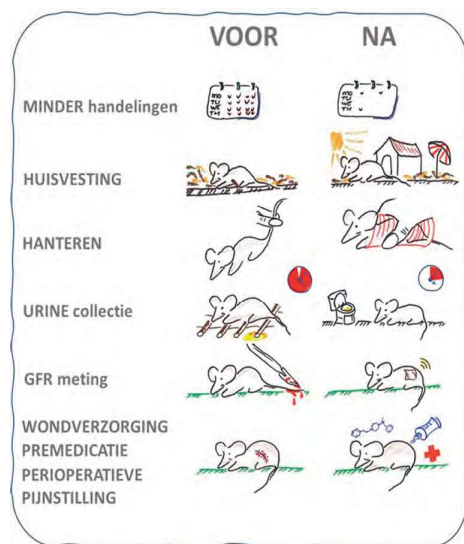
### Huisvesting

De experimenten worden gewoonlijk met mannelijke dieren uitgevoerd omdat mannen gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van nierschade. Volgens de leverancier konden de dieren in groepen gehuisvest worden. In onze dierfaciliteit zagen we echter dat, als we de dieren direct na binnenkomst in groepen huisvestten, de dieren tijdens de quarantaineperiode al wondjes ontwikkelden, zelfs zonder dat we ze zichtbaar zagen vechten. De ontstane wondjes heelden niet goed meer en dieren bleven vanwege stress ook aan de wondjes knagen. Op een leeftijd van acht weken (als ze volwassen zijn) waren er in alle kooien dieren met vechtwondjes aanwezig. Om dit te voorkomen hebben we vervolgens bestudeerd of het dan toch mogelijk is om de experimenten met vrouwelijke dieren uit te voeren en of het in dat geval wel mogelijk was om de dieren groepsgewijs te huisvesten. Maar helaas, ook bij de groepsgewijs gehuisveste vrouwelijke dieren ontstonden er al vrij snel huidwonden op de schouder. In de vervolgstudies is er daarom toch voor gekozen om mannelijke dieren te gebruiken en deze direct na binnenkomst individueel te huisvesten. Door deze huisvesting werd ongerief en uitval ten gevolge van huidwonden voorkomen. Bovendien leken de dieren optisch gezien minder stress te hebben.

Om het ongerief ten gevolge van de individuele huisvesting enigszins te verzachten is er op verzoek van de analisten een stelling aangeschaft (Vettech solutions Ltd , 931585 - BMI - Heated Cage Trolley - 6 x Shelf - 1284) waarmee het mogelijk is om een deel van de kooi te verwarmen, zodat het dier kan kiezen of deze op het verwarmde of onverwarmde deel van de kooi gaat zitten. Ook wordt de kooi standaard, naast de ruime hoeveelheid standaard kooiverrijking (wokkels, knaaghoutje, tunnel) voorzien van een extra 'tiny house' (kartonnen droomvilla). Bovendien wordt er gebruik gemaakt van open kooien zodat de dieren elkaar wel kunnen horen en ruiken.

### Hanteren

Om stress bij de dieren te verminderen wordt er gebruik gemaakt van de tunnel-hanteermethode, ook wel bekend als 'buisen voor de muizen'. Hierdoor is het hanteren van de muizen alleen aan de staart vrijwel nooit nodig.



In deze studieopzet zijn er tal van verbeteringen geïmplementeerd ter verfijning van de onderzoeksmethode, vermindering van het ongerief en verbetering van experimentele uitkomst. De veranderingen zijn doorgevoerd in het aantal handelingen met de dieren, de huisvesting met extra kooiverrijking en kooien met verschillende temperatuurzones, het invoeren van de tunnel-methode voor het hanteren, vermijden van de metabole kooien voor urinecollectie, een non-invasieve GFR (glomerular filtration rate)-meting en nog meer aandacht dan gewoonlijk voor wondverzorging en pijnstilling.

### Onderzoeksmethode

Ook werd er gekeken of het mogelijk is om door aanpassingen in de onderzoeksopzet de stress bij de dieren te voorkomen. Het bleek dat er, door wat aanpassingen in het studiedesign, een flinke vermindering in het aantal handelingen kon worden gerealiseerd en toch voldoende data was te verkrijgen. Voor het verzamelen van urine werd in eerste instantie gebruik gemaakt van metabole kooien. Nu wordt er voor de urinecollectie gebruik gemaakt van 'labsand'.

Dit labsand is een hydrofoob beddingmateriaal waar de urine bovenop blijft liggen, waardoor je vervolgens deze urine eenvoudig kunt verzamelen voor de benodigde analyses. Behalve dat de dieren nu niet meer op een rooster gehuisvest hoeven te worden, kan ook de tijd voor de urineverzameling verkort worden want drie uur labsand-urine komt ruwweg overeen met de hoeveelheid urine na 16 uur metabole kooi.

De standaard uitleesmethode om de nierschade te bepalen is het meten van de glomerulaire filtratie snelheid (GFR). Hiervoor wordt een fluorescente stof intraveneus toegediend waarna er op verschillende tijdstippen bloed wordt afgenomen om te zien hoe snel deze fluorescente stof wordt geklaard door de nier. Door al de bloedafnames is deze invasieve meetmethode vrij belastend voor de dieren. Daarom is er een nieuwe methode geïntroduceerd waarbij er gebruik wordt gemaakt van een non-invasieve transdermale GFR-meting (Transdermal mini-GFR monitor, Medibeacon1).

Hiervoor wordt er onder een isofluraan-roesje een chip met behulp van een plakstrip op een onthaard stukje huid vastgeplakt. Deze chip is in staat om direct door de huid de concentratie van de fluorescente stof te meten. Deze meting vindt elke seconde plaats (gedurende 2-3 uur) waardoor de uitkomst niet alleen betrouwbaarder is dan bij de traditionele methode, maar er bovendien geen bloedafnames meer nodig zijn.

Ook de toedieningsroute van de fluorescente stof is aangepast. In de standaardmethode werd de fluorescente stof intraveneus via de staartvene toegediend. In de KKAY-muizen werd dit lastig. Naar mate de dieren langer in proef zaten (ouder werden), ontwikkelden ze naast diabetes ook een hoge bloeddruk. Hierdoor waren de staarten, ondanks verwarmen, lastig aan te prikken waardoor de injecties moeizaam gingen en de metingen moeilijk of onbetrouwbaar werden. Soms gingen door de hierboven genoemde problemen ook staarten verloren vanwege necrose. Daarom is er overgestapt op retro-orbitale (RO)-injecties van de fluorescente stof in plaats van intraveneuze toediening. In een pilotexperiment zijn deze twee methodes naast elkaar gezet en waren de RO-injecties voor dit model het meest geschikt.

### Wondpreventie en behandeling

Na het verwijderen van de GFR-plakstrip werd er gezien dat er soms wat wondjes in het onthaarde gebied ontstonden. Om irritatie van de huid te verminderen en wondgenezing te bevorderen zijn er verschillende types wondzalf op basis van natuurlijke ingrediënten uitgetest (o.a. Aloë Vera, honing en tea tree-olie) die niet interfereren met diabetes en nierfalen. Uiteindelijk is gekozen voor Puur Wondgel en wordt het onthaarde gebied direct ingesmeerd met deze wondgel om schade aan de huid te voorkomen. Ook als er door een andere reden wondjes ontstaan wordt de huid gedurende vier dagen behandeld met deze wondgel.

### Anesthesie/analgesie voor nefrectomie

Aan het begin van de studie worden de dieren verdoofd voor de unilaterale nefrectomie-operatie (verwijderen van één nier). Deze verdoving vindt plaats met behulp van isofluraaninhalatie-anesthesie. Het viel de analisten op dat de dieren enorm gestrest waren vlak voordat ze onder zeil gingen en dat de muizen tijdens de anesthesie raspand adem haalden. Daarom is er besloten voor de toediening van premedicatie (fentanyl, midazolam) om de anesthesie rustig in te leiden. Door deze injecties met premedicatie gaan de dieren veel rustiger de narcose in, en komen ze er ook weer rustig uit.

Voor de pre- en postoperatieve pijnstilling wordt er gebruik gemaakt van Rimadyl in drinkwater. Op deze manier is het niet nodig om nog meer injecties te geven en zijn we toch in staat om de plasma-levels van de pijnstilling constant te houden. Een bijkomend voordeel is dat ze hierdoor geen grote gewichtsafname na de operatie laten zien. Ze herstellen sneller en zijn eerder weer terug op hun oude gewicht. Verder krijgen de dieren drie weken de tijd om te herstellen van de operatie voordat er andere handelingen op de dieren worden uitgevoerd. Om te compenseren voor het vochtverlies tijdens de operatie en de langdurige anesthesie wordt er verwarmd fysiologisch zout s.c. toegediend na deze ingreep.

Zoals de jury het beschreef is geen van deze aanpassingen nieuw, maar juist het feit dat de onderzoekers aandacht besteedden aan vrijwel elk aspect in de verzorging en de open communicatie tussen de diervverzorgers, onderzoekers en de Instantie voor Dierenwelzijn werd door de commissie enorm gewaardeerd. Wat de jury benadrukte is dat dit onderzoek een goed voorbeeld is van hoe verfijning tot een beter wetenschappelijk onderzoek kan leiden, omdat alle aanpassingen niet alleen hebben geleid tot een beter welzijn voor de dieren, maar dat ook de uitkomsten van de studieresultaten hierdoor verbeterd zijn.

### Bron

1. Schock-Kusch, D., Geraci, S., Ermeling, E., Shulhevich, Y. & Sticht, C. Reliability of Transcutaneous Measurement of Renal Function in Various Strains of Conscious Mice. PLoS One 8, 71519 (2013).