

# **Gezondheid en welzijn van genetisch gemodificeerde dieren**

**Kerngetallen afkomstig van 3 laboratoria**

**Nina Cohen  
Anja Hazekamp  
Tjard de Cock Buning**

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij  
Directie Wetenschap en Kennisoverdracht  
Stuurgroep Technology Assessment

Den Haag 2003



## VOORWOORD

Dieren worden in het wetenschappelijk onderzoek al eeuwen lang gebruikt om nieuwe biologische inzichten te verwerven en om nieuwe stoffen en technieken te testen. Dat gebruik is de laatste decennia steeds meer controversieel geworden. Aanhoudende druk vanuit de samenleving heeft geleid tot een steeds selectiever gebruik van proefdieren. Waar mogelijk worden dieren in proeven vervangen door andere organismen of worden “hogere” diersoorten vervangen door “lagere” diersoorten. Voor het testen van cosmetica mogen in Nederland in het geheel geen proefdieren meer worden gebruikt.

Inmiddels is daar een tweede controversie bijgekomen: gebruik van gentechnologie. De kritiek op gentechnologie richt zich meer op toepassing in de landbouw dan op toepassing in de medische sfeer. Enigszins in strijd daarmee krijgt toepassing op dieren meer kritiek dan toepassing bij planten en micro-organismen. Heeft de Nederlandse overheid met betrekking tot planten gekozen voor een “ja, mits” beleid, voor dieren geldt een “nee, tenzij” beleid. Dat dwingt onderzoekers tot grote terughoudendheid.

De belangrijkste zorg van critici is dat gentechnologie bij proefdieren leidt tot (onvoorziene) aantasting van hun gezondheid en hun welzijn. Daarom is het zaak om de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde organismen systematisch te monitoren.

Dit rapport, geschreven in opdracht van de Stuurgroep Technology Assessment van het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, levert:

- een kritische analyse van de stand van zaken m.b.t. monitoring van welzijn en gezondheid van genetische gemodificeerde proefdieren in een drietal laboratoria;
- een methodiek voor een dergelijke monitoring;
- aanbevelingen voor de organisatie van monitoring en registratie.

De Stuurgroep Technology Assessment is van mening dat bij gebruik van proefdieren in het algemeen en bij toepassing van gentechnologie in het bijzonder, grote terughoudendheid is geboden. Voor die gevallen waarin toepassing verantwoord wordt geacht, biedt dit rapport waardevolle aanbevelingen. Wij brengen het daarom met nadruk onder de aandacht van onderzoekers, beleidsmakers en andere betrokkenen.

Utrecht, april 2003

drs. W.J. van der Weijden  
Voorzitter Stuurgroep Technology Assessment



# **INHOUDSOPGAVE**

## **VOORWOORD**

## **INHOUDSOPGAVE 2**

## **INLEIDING 4**

## **HOOFDSTUK 1 ANALYSE VAN DE HUIDIGE SITUATIE: Situatieschets en aandachtspunten 6**

1.1 Vragen over het maken van genetisch gemodificeerde dieren 6

1.2 Vragen over het fokken van genetisch gemodificeerde dieren 7

1.3 Vragen over de invloed van genetische modificatie op het gedrag 8

1.4 Vragen over de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde dieren 8

1.5 Vragen over de registratie van genetisch gemodificeerde dieren 10

1.6 Betekenis van de aandachtspunten voor beleidsmakers, onderzoeksinstellingen en maatschappelijke organisaties: twee aanbevelingen 10

## **HOOFDSTUK 2 AANDACHTSPUNTEN NADER BESCHOUWD 11**

2.1 Welzijn en het maken van founders 11

2.2 Welzijn, fok en huisvesting 12

2.3 Welzijn en nevenpathologie 18

2.4 Welzijn en management 19

## **HOOFDSTUK 3 BELEIDSAANBEVELINGEN 23**

Welzijnsteam 23

Centraal databestand 23

Landbouwhuisdieren 27

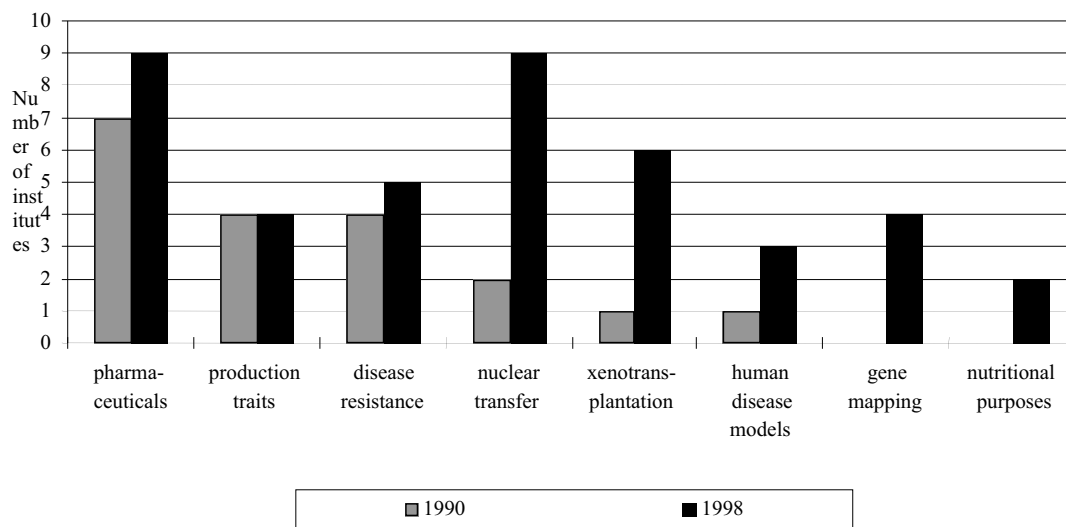
|   |  |           |
|---|--|-----------|
| <b>BIJLAGEN</b>                                 | Bijlage 1 Onderzoeksopzet                                | 28        |
|   | Bijlage 2 Data-analyse                                   | 29        |
|   | Bijlage 3 Het maken van een genetisch gemodificeerd dier | 36        |
|   | Bijlage 4 De fok en zorggedrag                           | 44        |
|   | Bijlage 5 Nevenpathologie                                | 46        |
| <b>Literatuur</b>                               |  | <b>48</b> |
| <b>Begeleidingscommissie</b>                    |  | <b>49</b> |
| <b>LNV-Programma Technology Assessment (TA)</b> |  | <b>50</b> |
| <b>Lijst van publicaties in de TA-reeks</b>     |  | <b>51</b> |

## INLEIDING

De ontwikkelingen op het gebied van de biotechnologie bij dieren gaan snel. Er is echter nog weinig bekend over de invloed van genetische modificatie op het welzijn van de dieren. Toch hebben alle betrokken partijen belang bij meer inzicht in het welzijn van genetisch gemodificeerde dieren. Dierenbeschermingsorganisaties richten zich op het mogelijke lijden van genetisch gemodificeerde proefdieren, onderzoekers vrezen onverwachte effecten die het onderzoek kunnen beïnvloeden, de overheid wil tot vertrouwenwekkende regelgeving komen en ethische commissies menen dat alleen voldoende kennis over de welzijnseffecten van biotechnologische handelingen kan leiden tot een goed advies.

De afdeling Dierproefvraagstukken van de Faculteit Geneeskunde van de Universiteit Leiden heeft in 1998 in een pilotstudy in kaart gebracht, wat er bekend is over het welzijn van transgene landbouwhuisdieren (Hazekamp & de Cock Buning, 1998; 2000). Voor dit onderzoek zijn 39 instituten en bedrijven benaderd, die genetisch gemodificeerde koeien, varkens, schapen, geiten, kippen of konijnen hadden vervaardigd. Deze instituten en bedrijven bevonden zich in Europa, Amerika, Canada en Australië.

Uit de enquêtes en interviews kwamen een aantal trends in de dierlijke biotechnologie naar voren. Zo bleek dat instituten en bedrijven de laatste jaren meer diersoorten gebruiken. Ook het aantal toepassingen per bedrijf is toegenomen. In het begin van de jaren negentig was elk bedrijf of instituut voornamelijk gespecialiseerd in één toepassing bij één diersoort (bijvoorbeeld de productie van eiwitten in de melk van schapen). Nu werken veel bedrijven aan een breed scala van toepassingen en gebruiken diverse diersoorten (zie figuur 1). Verder bleek dat vooral het aantal moreel problematische toepassingen sterk in aantal is toegenomen. Het betreft met name toepassingen op het gebied van xenotransplantatie en kloneren (=nuclear transfer).



Figuur 1: toename van instituten die transgenese toepassen in 1990 en 1998.

Tevens bleek dat de helft van de onderzoekers, alvorens genetisch gemodificeerde landbouwhuisdieren te maken, een voorstudie uitvoerden in genetisch gemodificeerde muizen. In deze voorstudie werd tevens bestudeerd of zich geen gezondheids- en welzijnsproblemen in de muizen voordeden. Desondanks bleek deze werkwijze geen garantie voor het uitblijven van gezondheids- en welzijnsproblemen bij de landbouwhuisdieren. Volgens de onderzoekers was een deel van de welzijnsproblemen bij de transgene landbouwhuisdieren te voorkomen geweest, als men meer gedetailleerd en gestructureerd naar het welzijn van de transgene muizen in het voortraject had gekeken.

In het vervolgonderzoek, beschreven in dit rapport, was het uitgangspunt dat bestaande gegevens die worden genoteerd in laboratoria met betrekking tot het maken en de fok van genetisch gemodificeerde muizen inzicht kunnen geven in de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde muizen. Deze gegevens zijn van belang voor de ethische vragen rond genetische modificatie van muizen en landbouwhuisdieren. Dit laatste omdat kennis over het welzijn van genetisch gemodificeerde muizen meer inzicht kan geven in het welzijn van transgene landbouwhuisdieren.

#### *Werkwijze en indeling van het rapport*

In 1999 zijn alle bestaande en relevante data die in laboratoria worden genoteerd met betrekking tot het maken en de fok van genetisch gemodificeerde muizen verzameld bij drie laboratoria in Nederland. De werkwijze was als volgt. Alvorens tot dataverzameling over te gaan, zijn in een workshop de te volgen methodiek, de keuze van parameters (de data die voor dit onderzoek relevant zijn) en de opgestelde nulhypothese, besproken en afgestemd met ter zake deskundigen uit het veld, zoals proefdierdeskundigen, onderzoekers en managers van transgene units. Vervolgens zijn de data verzameld.

De data zijn afkomstig van drie bronnen. De eerste databron bestond uit de genoteerde gegevens afkomstig van de foklijsten, de administratie van de transgene unit, de pathologische rapporten en uit notities van de biotechnisch analist en onderzoekers. De tweede databron betrof mondelinge informatie van werknemers met praktijkervaring in het werkveld (dierverzorgers, analisten, proefdierdeskundigen) en interviews met wetenschappelijk personeel (biomedisch onderzoekers, pathologen). Data over zorggedrag en gewichtsverloop werden uit eigen observatie verkregen, omdat deze gegevens niet standaard worden genoteerd in de foklijsten, en vormden daarmee de derde databron. De data zijn geanalyseerd en verwerkt in een aantal aandachtspunten, conclusies en aanbevelingen. Met de geformuleerde aandachtspunten is aangegeven waar zich welzijnsproblemen kunnen voordoen tijdens het maken en fokken van genetisch gemodificeerde dieren. Het betreft situaties die extra aandacht verdienen. Er wordt echter niet gesuggereerd dat hiermee een volledig beeld wordt gegeven van de welzijnsstatus van genetisch gemodificeerde dieren. Een goede welzijnsbewaking omvat meer aandachtspunten. Het samenstellen van de juiste criteria waarop een goede en volledige welzijnbewaking is gebaseerd valt buiten het bestek van dit onderzoek. In dit onderzoek is getracht een aanzet te geven tot het verhelderen van deze criteria.

De resultaten worden trapsgewijs toegelicht: van beknopt en toegankelijk tot uitgebreid en meer specialistisch. Op deze wijze kan iedereen, ook degenen die niet gespecialiseerd zijn in genetische modificatie, kennis nemen van de resultaten. Hoofdstuk 1 beschrijft beknopt de aandachtspunten die uit het onderzoek naar voren kwamen. Door middel van een vraag en antwoord opzet wordt kort de gevonden situatie geschetst, gevolgd door een of meer aandachtspunten. In hoofdstuk 2 wordt dieper ingegaan op de verzamelde data, de wijze waarop de data zijn verzameld, en de daaruit volgende conclusies. Hoofdstuk 3 resulteert in twee beleidsaanbevelingen en geeft aan hoe overheid, onderzoeksinstituten en beroepsgroepen betrokken kunnen zijn bij de uitvoering van deze aanbevelingen. De bijlagen bevatten tenslotte een gedetailleerde beschrijving van de onderzoeksopzet en resultaten.

Na afloop van de dataverzameling en de data-analyse zijn de resultaten wederom in een workshop voorgelegd aan onderzoekers en biotechnici van de drie betreffende laboratoria en proefdierdeskundigen van deze en andere laboratoria. Het bleek dat de resultaten overeenkwamen met de ervaringen van de betreffende deskundigen en representatief zijn voor ten minste drie andere laboratoria. Een Europees onderzoek kwam tot vergelijkbare conclusies (Delpire, 1999).

In een derde workshop zijn de resultaten besproken met maatschappelijke groeperingen.



## **HOOFDSTUK 1 ANALYSE VAN DE HUIDIGE SITUATIE: Situatieschets en aandachtspunten**

In dit hoofdstuk wordt een korte schets gegeven van de huidige situatie in drie laboratoria die genetisch gemodificeerde dieren maken. Met de geformuleerde aandachtspunten wordt aangegeven waar zich welzijnsproblemen kunnen voordoen tijdens het maken en fokken van genetisch gemodificeerde dieren. Het betreft situaties die extra aandacht verdienen. In hoofdstuk 2 worden de aandachtspunten onderbouwd en wordt aangegeven op welke wijze (uit welke bron) de data zijn verkregen.

### **1.1 VRAGEN OVER HET MAKEN VAN GENETISCH GEMODIFICEERDE DIEREN**

**Vraag:**

Hoeveel dieren zijn er nodig om een transgene stamouder te maken?

**Antwoord:**

Er zijn 30 tot 50 dieren nodig.

**Toelichting:**

Een transgene stamouder is een dier waarbij in het erfelijk materiaal een extra stukje DNA (een zogenaamd genconstruct) is *ingebracht*. Er zijn veel dieren nodig om een stamouder te maken. Het slagingspercentage is afhankelijk van een aantal factoren, zoals de invloed van het ingebrachte stukje DNA, de faciliteiten, de methode van werken en de ervaring van het personeel. Een knock-out stamouder is een dier waarbij een stukje DNA is *verwijderd* uit het erfelijk materiaal. Het aantal dieren dat nodig is om een knock-out stamouder te maken, wisselt sterk.

**Aandachtspunt 1:**

**Inzicht in en optimaliseren van factoren die invloed hebben op het slagingspercentage, dragen bij aan de vermindering van het aantal dieren die nodig zijn om een founderdier te maken.**

**Vraag:**

Treedt er ongerief op bij het dekken?

**Antwoord:**

Er treedt in een aantal gevallen ongerief op.

**Aandachtspunt 2:**

**Jonge vrouwtjes (4 tot 6 weken oud) worden gebruikt als donor van de embryo's. Deze vrouwtjes zijn aanzienlijk kleiner en lichter dan het dekmannetje. Dit heeft tot gevolg het dekken de vrouwtjes ongerief toebrengt.**

## 1.2 VRAGEN OVER HET FOKKEN VAN GENETISCH GEMODIFICEERDE DIEREN

**Vraag:**

Bijten moeders hun eerste jongen vaak dood?

**Antwoord:**

Ja, omdat deze moeders nog onervaren zijn in het moederschap.

**Aandachtspunt 3:**

**Een jonge moeder die samen met een ervaren moeder in een bak geplaatst wordt, leert het moederschap van de ervaren moeder. Sterfte onder de jongen als gevolg van de onervarenheid van de jonge moeder blijkt op deze wijze te kunnen worden verminderd.**

**Vraag:**

Wat gebeurt er als er meer fokvrouwjes bij een fokman worden geplaatst?

**Antwoord:**

In dat geval kan er overbevolking ontstaan. Dit leidt tot de dood van de jongste, kleinste en meest kwetsbare jongen.

**Aandachtspunt 4:**

**Dierenwelzijnproblemen als gevolg van overbevolking ontstaan, wanneer er meer dan twee fokvrouwjes bij het fokmanneling worden geplaatst.**

**Vraag:**

Wat is kannibalisme?

**Antwoord:**

Als dieren elkaar opeten heet dit kannibalisme.

**Toelichting:**

Als er met succes een stamouder is gemaakt, wordt er met het dier verder gefokt om de beschikking te hebben over voldoende dieren voor het experiment. Veelal vereist het onderzoek dat het benodigde aantal dieren op korte termijn wordt verkregen. Daarom worden er veel fokdieren bij elkaar gezet. Deze situatie kan problemen geven, zoals kannibalisme, stress, competitie en verdrukking. Het komt regelmatig voor dat ouderdieren hun jongen opeten.

**Aandachtspunt 5:**

**Kannibalisme wordt gescoord als "sterfte" of "verdwenen jongen", zonder ongeriefscore. Kannibalisme moet gescoord worden als ernstig ongerief, omdat de jongen niet altijd dood zijn, als ze worden opgegeten.**

**Aandachtspunt 6:**

**De wens om snel tot fokresultaten te komen kan ten koste gaan van het welzijn van de fokdieren.**

### 1.3 VRAGEN OVER DE INVLOED VAN GENETISCHE MODIFICATIE OP HET GEDRAG

**Vraag:**

Kan genetische modificatie het gedrag van dieren beïnvloeden?

**Antwoord:**

Ja, er zijn genconstructen die het gedrag beïnvloeden. De dieren kunnen als gevolg van de modificatie agressiever of nerveuzer gedrag vertonen.

**Toelichting:**

In sommige onderzoeksgebieden wil men meer te weten komen over gedragsstoornissen, zoals depressiviteit, angst en agressie. In deze onderzoeksgebieden worden genetisch gemodificeerde dieren gemaakt waarbij in het erfelijk materiaal veranderingen zijn aangebracht die met het gedrag van de dieren te maken hebben. Dit kan gevolgen hebben voor het gedrag tussen ouderdieren en hun jongen en voor ander sociaal contact.

**Aandachtspunt 7:**

**Ouderdieren die als gevolg van de modificatie stressgevoeliger en nerveuzer zijn, kunnen slecht zorggedrag vertonen, zoals kannibalisme of verwaarlozing. Gemodificeerde mannetjes, gebruikt in agressieonderzoek, die bij elkaar in een bak werden gezet, kunnen verhoogd onderling agressief gedrag vertonen.**

### 1.4 VRAGEN OVER DE GEZONDHEID EN HET WELZIJN VAN GENETISCH GEMODIFICEERDE DIEREN

**Vraag:**

Is de sterfte onder genetisch gemodificeerde dieren hoger dan onder dieren die niet genetisch gemodificeerd zijn?

**Antwoord:**

Ja.

**Aandachtspunt 8:**

**Er worden 3,6 maal zoveel jongen van genetisch gemodificeerde ouderdieren doodgeboren als van niet genetisch gemodificeerde ouderdieren. Bovendien gaan 2,3 keer zoveel jongen van genetisch gemodificeerde ouderdieren dood tussen geboorte en spenen, als jongen van niet genetisch gemodificeerde ouderdieren.**

**Vraag:**

Zijn er muizenstammen die stereotiep (herhaald en ogenschijnlijk niet functioneel) gedrag vertonen?

**Antwoord:**

Ja, er zijn muizenstammen die stereotiep gedrag vertonen, zoals draaien en springen.

**Aandachtspunt 9:**

**In onderzoek wordt gebruik gemaakt van diverse muizenstammen. Het genetisch materiaal van deze muizenstammen is niet identiek. Genconstructen komen in verschillende muizenstammen op verschillende wijze tot expressie. Genconstructen die zijn ingebracht in muizenstammen met stereotiep gedrag kunnen mogelijk tot extra welzijnsproblemen leiden.**

**Vraag:**

Zijn onderzoekers op de hoogte van de invloed van de uitgevoerde genetische modificatie op de gezondheid en het welzijn van de dieren?

**Antwoord:**

Niet altijd.

**Aandachtspunt 10:**

**Onderzoekers zijn niet altijd goed op de hoogte van de gezondheid en het welzijn van de gemodificeerde dieren. De onderzoeker ziet de dieren niet regelmatig en laten zieke of dode dieren slechts in weinig gevallen onderzoeken door een patholoog.**

**Vraag:**

Wordt de gezondheid en het welzijn van dieren dagelijks gecontroleerd?

**Antwoord:**

Nee.

**Aandachtspunt 11:**

**Door de hoge werkdruk bij de dierverzorgers, worden de dieren slechts een of twee keer per week gecontroleerd. Tevens is het zicht in de bakken onvoldoende door de positie van de waternippel, voorwerpen in de bak (tissues, doosjes) en door het feit dat de bakken hoog worden opgestapeld.**

**Vraag:**

Is er veel ongerief onder genetisch gemodificeerde dieren?

**Antwoord:**

Het geregistreerde, gemiddelde geleden ongerief is gering tot gering/matig. Echter, het geraadpleegde databestand was niet volledig en onderzoekers zijn niet opgeleid om het geleden ongerief te kunnen schatten. Uit eigen analyse van de gegevens blijkt dat er een relatie is tussen ongerief en het veranderen van het erfelijk materiaal. Transgenen en knock-outs hebben gemiddeld meer ongerief geleden dan wildtype dieren.

**Aandachtspunt 12:**

**Het ongerief wordt door onderzoekers gescoord. Onderzoekers zijn niet getraind in het herkennen van gezondheid- en welzijnsproblemen bij dieren.**

## 1.5 VRAGEN OVER DE REGISTRATIE VAN GENETISCH GEMODIFICEERDE DIEREN

**Vraag:**

Worden alle dieren die zijn betrokken bij genetische modificatie geregistreerd als proefdier?

**Antwoord:**

Nee. De dekmannetjes en veel fokdieren worden niet geregistreerd als proefdier.

**Toelichting:**

De Registratie dierproeven en proefdieren van het ministerie van VWS houdt bij hoeveel proefdieren er jaarlijks worden gebruikt voor fok en onderzoek. Het dekken en fokken van dieren wordt niet geregistreerd, tenzij er sprake is van ongerief.

**Aandachtspunt 13:**

**Alle handelingen met betrekking tot het maken en het fokken van genetisch gemodificeerde dieren zijn gericht op het beantwoorden van een wetenschappelijke vraag. Het registreren van alle dieren betrokken bij genetische modificatie geeft een beter beeld van het aantal gebruikte dieren.**

## 1.6 BETEKENIS VAN DE AANDACHTSPUNTEN VOOR BELEIDSMAKERS, ONDERZOEKSINSTELLINGEN EN MAATSCHAPPELIJKE ORGANISATIES: TWEE AANBEVELINGEN

Om een beter inzicht te verkrijgen in de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde dieren tijdens het maken, de fok en het experiment, moeten welzijnsgegevens genoteerd worden die toegankelijk zijn voor alle belanghebbende partijen. Dit kan worden bereikt door het instellen van een welzijnsteam en een centraal databestand.

**Aanbeveling 1: WELZIJNSTEAM**

Ieder onderzoeksinstituut moet een welzijnsteam installeren, dat bestaat uit een welzijnsmedewerker die is belast met de welzijnsmonitor, en een patholoog, die zieke of dode dieren en nieuwe lijnen aan een standaard histopathologisch onderzoek onderwerpt.

**Aanbeveling 2: CENTRAAL DATABESTAND**

Alle gegevens over het maken, de founderselectie, de fok en het onderzoek van de genetisch gemodificeerde lijnen binnen een onderzoeksinstituut, moeten geregistreerd worden in een centraal databestand dat voor alle belanghebbenden toegankelijk is.

## HOOFDSTUK 2 AANDACHTSPUNTEN NADER BESCHOUWD

In het voorgaande hoofdstuk zijn een aantal aandachtspunten geformuleerd rond de gezondheid en het welzijn van transgene dieren. In dit hoofdstuk wordt dieper ingegaan op de achtergronden en resultaten van het onderzoek, worden de aandachtspunten nader onderbouwd en worden enkele conclusies geformuleerd.

### 2.1 WELZIJN EN HET MAKEN VAN FOUNDERS

*Aandachtspunt 1:*

*Inzicht in en optimaliseren van factoren die invloed hebben op het slagingspercentage, dragen bij aan de vermindering van het aantal dieren die nodig zijn om een founderdier te maken.*

*Het maken van een genetisch gemodificeerd dier*

Een genetisch gemodificeerd dier is een dier waarvan het erfelijk materiaal is veranderd. Er zijn verschillende manieren om genetisch gemodificeerde dieren te maken. In bijlage 3 worden de twee meest gebruikte methoden, micro-injectie en de embryonale stamcelmethode (ES methode), besproken. Door micro-injectie wordt een extra gen (= stukje DNA dat zorgt voor een bepaalde eigenschap) aan het erfelijk materiaal van het dier toegevoegd, waardoor een zogenaamd transgeen dier ontstaat. Door de embryonale stamcelmethode is het mogelijk om een actief gen van het dier uit te schakelen. Hierdoor verliest het dier de oorspronkelijke eigenschap die bij het gen hoort. Dit noemt men een knock-out dier. Als de genetische modificatie geslaagd is voor een bepaald gen, dan heeft men een founder (= stamouder) verkregen, waarmee men verder gaat fokken.

*Voorwaarden voor een succesvolle founder*

Uit de praktijkervaring van biotechnisch analisten blijkt dat het succesvol maken van founders onder invloed staat van een aantal factoren, te weten:

- de invloed van het genconstruct,
- de startfase
- de efficiency van de handelingen: verbeterde technieken,
- seizoensinvloeden,
- de methode (micro-injectie versus electroporatie),
- de overleving na selectie van de klonen,
- zootechnische en omgevingsfactoren (infecties),
- de ervaring en opleiding van de analisten die de founders maken,
- goede kwaliteit genconstruct/DNA,
- onbekende factoren

Uit gegevens verzameld in laboratorium 2 is in deze studie berekend hoeveel dieren nodig zijn om een founder te maken (zie bijlage 3).

#### **Conclusie**

Als er onvoldoende rekening gehouden wordt met bovengenoemde factoren dan zijn er meer dieren nodig om een founder te maken en is het slagingspercentage laag. Er zijn er niet meer dan dertig tot vijftig dieren nodig voor het maken van een transgene founder. Dit aantal kan in de toekomst wellicht nog verder worden teruggebracht door optimalisatie van de technieken. Alle factoren die invloed hebben op het aantal dieren dat nodig is om een stamouder te maken, dienen optimaal te zijn. Er is beter inzicht nodig in de factoren die de slagingskans beïnvloeden, om het aantal gebruikte dieren verder te beperken.

## 2.2 WELZIJN, FOK EN HUISVESTING

Muizen zijn seksueel volwassen als ze 4 weken oud zijn, maar dit varieert echter aanzienlijk tussen de verschillende stammen. De draagtijd bedraagt 19-21 dagen en de jongen worden gemiddeld 4 weken gezoogd. De moeder kan direct na de geboorte van de jongen weer bevrucht worden (postpartus oestrus). De worpgrootte is ook afhankelijk van de stam en kan variëren van 1-10 pups. De eerste nesten zijn vaak iets kleiner. Ook de overleving van de jongen is bij een onervaren moeder iets lager. Naarmate de vrouwtjesdieren ouder worden neemt de nestgrootte af, maar de overlevingskans van de jongen neemt iets toe (informatie Jax-informatics, 1999; Poole, 1987). Alle stappen die in het fokproces genomen worden, zullen in dit hoofdstuk kort worden toegelicht.

### *Dekken*

#### *Aandachtspunt 2:*

*De embryodonoren zijn aanzienlijk kleiner en lichter dan het dekmannetje. Dit heeft tot gevolg dat het dekken de vrouwtjes ongerief toebrengt.*

Om met micro-injectie transgene dieren te maken zijn bevruchte eicellen (embryo's) nodig. Deze embryo's zijn afkomstig van vrouwtjes, de embryodonoren, die net geslachtsrijp zijn geworden, (4 tot 6 weken oud) en die een hormoonbehandeling hebben ondergaan om een grote hoeveelheid rijpe eicellen te laten vrijkomen (superovulatie). Men kiest voor jonge vrouwtjes, omdat er op deze leeftijd de meeste embryo's verkregen kunnen worden. Deze vrouwtjes zijn geslachtsrijp, maar hebben hun maximale gewicht en grootte nog niet bereikt. Het dekken van deze jonge vrouwtjes vindt plaats met mannetjes die groter en zwaarder zijn. Twee proefdierdeskundigen gaven aan, in een mondelinge mededeling, dat het dekken naar hun mening en inzicht de vrouwtjes ongerief bezorgt, als gevolg van het verschil in gewicht en grootte.

### *Onervaren moeder*

#### *Aandachtspunt 3:*

*Een jonge moeder die samen met een ervaren moeder in een bak geplaatst wordt, leert het moederschap van de ervaren moeder. Sterfte onder de jongen als gevolg van de onervarenheid van de jonge moeder wordt op deze wijze verminderd.*

In laboratorium 2 zijn alle vrouwtjes die in fok worden gezet onervaren, dat wil zeggen de vrouwtjes hebben nog niet eerder een nest gehad. Uit de praktijkervaring van de dierverzorgers is het bekend dat een onervaren moeder haar jongen vaker zal doodbijten. In de andere twee laboratoria worden bij de onervaren moeders ervaren moeders geplaatst, die de jonge vrouwtjes het moederschap leren. Het blijkt dat niet ieder laboratorium kiest voor deze aanpak..

### *Overbevolking*

#### *Aandachtspunt 4:*

*Dierenwelzijnproblemen als gevolg van overbevolking ontstaan, wanneer er meer dan twee fokvrouwtjes bij het fokmannetje worden geplaatst.*

Vaak worden er drie tot vier vrouwtjes bij een of meerdere mannetjes gezet, om snel fokresultaat te krijgen en ruimte te sparen. Deze situatie veroorzaakt overvolle bakken, wanneer de vrouwtjes goede fokkers zijn en meerdere (grote) nesten produceren. In dit geval treft men nesten aan van verschillende leeftijd, met oudere, grotere en brutalere jongen, wat kan leiden tot de dood van de jongste, kleinste en meest kwetsbare dieren door competitie of verdrukking. Men heeft niet overwogen om het aantal vrouwtjes per mannetje te beperken tot een of twee, omdat een 1:4 ratio uiteindelijk het hoogste aantal jongen geeft, ondanks de grote sterfte. Een goed fokresultaat wordt belangrijker gevonden dan het grote aantal dode jongen.

## *Kannibalisme*

### *Aandachtspunt 5:*

*Kannibalisme wordt gescoord als "sterfte" of "verdwenen jongen", zonder ongeriefscore. Kannibalisme moet gescoord worden als ernstig ongerief, omdat de jongen niet altijd dood zijn, als ze worden opgegeten.*

Overbevolking, onervarenheid van de moeder en genetisch modificatie die gedragsveranderingen veroorzaken, kunnen, volgens de diervverzorgers, kannibalisme in de hand werken. Als dit het geval is wordt in de foklijsten vermeld dat de dieren zijn 'gestorven' of 'verdwenen', zonder dat er een ongeriefscore wordt gegeven. Dit geeft een onvolledig beeld, omdat een deel van de dieren wel ongerief heeft geleden.

### *Aandachtspunt 6*

*De wens om snel tot fokresultaten te komen mag niet ten koste gaan van het welzijn van de fokdieren.*

## *Zorggedrag*

### *Aandachtspunt 7a:*

*Ouderdieren die als gevolg van de modificatie stressgevoeliger en nerveuzer zijn, kunnen slecht zorggedrag vertonen, zoals kannibalisme of verwaarlozing.*

Goed zorggedrag is niet alleen essentieel voor het welzijn van de jongen, het geeft ook meer inzicht in de welzijnsstatus van de ouderdieren. Er zijn aanwijzingen dat zorggedrag een genetische basis heeft (Brown, 1996; Li, 1999). Uit deze publicaties en uit eigen observatie blijkt dat veranderingen in het erfelijk materiaal kunnen leiden tot afwijkend zorggedrag bij de ouderdieren. Bovendien kunnen genetisch gemodificeerde jongen bepaald afwijkend gedrag vertonen dat van invloed kan zijn op het zorggedrag van de ouders en dus op het welzijn van de jongen. Kannibalisme of verwaarlozing kunnen het gevolg zijn van een verstoord welzijn van de ouders dan wel van de jongen.

In laboratoria 2 en 3 is het zorggedrag geobserveerd. Uit de resultaten blijkt dat er een verband bestaat tussen zorggedrag en achtergrondstam en tussen zorggedrag en type onderzoek (272 observaties). Dieren met een C57BL/6 achtergrond en kruisingen hiervan, zorgen beter voor hun jongen dan dieren van een andere stam. Dieren die gebruikt werden voor immunologisch onderzoek vertoonden beter zorggedrag dan dieren gebruikt door andere onderzoeksgebieden. het onderzoeksgebied geestesziekten gaf daarentegen het tegengestelde resultaat. De dieren vertoonden aanmerkelijk slechter zorggedrag dan de genetisch gemodificeerde dieren van andere onderzoeksgebieden (zie ook bijlage 4).

### **Conclusie**

Genconstructen die invloed uitoefenen op het gedrag van het dier kunnen potentieel invloed hebben op het zorggedrag. Tijdens de zorgperiode moet extra aandacht aan het welzijn van de dieren worden besteed, als verwacht wordt dat de dieren door de modificatie gedragsveranderingen zullen krijgen. Te denken valt aan het vaker observeren en het weren van externe stressfactoren.

## *Agressie, stress en huisvesting*

### *Aandachtspunt 7b:*

*Gemodificeerde mannetjes, gebruikt in agressieonderzoek, die bij elkaar in een bak werden gezet, kunnen verhoogd onderling agressief gedrag vertonen.*

Mannetjes worden na het spenen bij elkaar of alleen in een bak gezet. Uit de praktijkervaring van diervverzorgers blijkt dat beide situaties welzijnsproblemen geven. De dieren gaan, als ze met meerdere



dieren in een bak geplaatst worden, vechten om een rangorde te bepalen. Dieren die alleen in een bak worden geplaatst, raken als groepsdier sociaal geïsoleerd.

In laboratorium 2 werd ten behoeve van een bepaald experiment besloten de mannetjes bij elkaar in een bak te plaatsen, omdat men de dieren onder gelijke sociale omstandigheden wilde laten opgroeien. Het betrof knock-out mannen, waarbij het betreffende genconstruct een verwachte invloed had op het gedrag van de dieren. Uit eigen observatie en uit mondelinge mededelingen van de diervverzorgers bleek dat als gevolg van deze huisvestingssituatie, er regelmatig hevig werd gevochten in de bakken. De mannetjes die de agressor trachtten te ontwijken, stonden rechtop tegen de wand van de bak en bleven lange tijd in deze positie staan.

### **Conclusie**

Een genconstruct dat ingrijpt op het gedrag, beïnvloedt de sociale interacties tussen de dieren en kan leiden tot ongewenst agressief gedrag of ander sociaal gedrag. Dierexperimentencommissies (DECs) moeten in hun advies speciale aandacht geven aan het welzijn en de huisvesting van genetisch gemodificeerde stammen die gedragsafwijkingen kunnen vertonen als gevolg van de modificatie.

### *Nestgrootte bij de geboorte*

De gegevens over de fok, zoals genoteerd in de foklijsten, in laboratorium 1 beperken zich tot de nestgrootte bij het spenen. In laboratoria 2 en 3 wordt ook de nestgrootte bij de geboorte genoteerd (zie ook tabel 4, bijlage 2). Uit eigen data-analyse bleek dat er significante verschillen zijn tussen de nestgrootte en het al dan niet ingrijpen in het erfelijk materiaal van de dieren (870 nesten beschreven). De gemiddelde nestgrootte bij de geboorte was voor de wildtype muizen (niet-gemodificeerde dieren) hoger (8,3 jongen) dan voor de gemodificeerde muizen (5,4 jongen). Daarnaast was de gemiddelde nestgrootte van de kruisingen tussen transgenen en knock-outs hoger (6,7 jongen) dan die van de kruisingen tussen knock-outs onderling (5 jongen). Er waren ook verschillen in nestgrootte tussen de verschillende typen onderzoek (745 nesten beschreven). Bij onderzoek naar geestesziekten waren de nesten gemiddeld kleiner (4,5 jongen) dan bij onderzoek op het gebied van de immunologie en de fysiologie (5,9 jongen). Daarnaast bleek er een verschil te zijn in de gemiddelde nestgrootte tussen de verschillende stammen (798 nesten beschreven). Gemodificeerde muizen die behoren tot de FVB/n-stam of een kruising hiervan hadden gemiddeld grotere nesten (6,7 jongen) dan gemodificeerde muizen die niet tot deze stam behoren (5,6 jongen).

De nestgrootte bleek sterk te variëren tussen de laboratoria. Controlegegevens van de betreffende laboratoria zelf zijn daarom betrouwbaarder dan gegevens uit de literatuur. Uit de data-analyse bleken gemodificeerde muizen met een C57BL/6 achtergrond een gemiddelde nestgrootte van 5,8 jongen te hebben. Gegevens over wildtype muizen uit laboratorium 3, met een gemengde genetische achtergrond van C57BL/6, gaven aan dat gemiddeld per nest 6,4 nakomelingen geboren worden (niet in tabel). Deze waarden zijn iets lager dan de waarden beschreven in de literatuur (6,7 jongen per nest; Poole, 1987; Taketo et al., 1991). Gemodificeerde muizen met een FVB/n achtergrond hadden volgens eigen analyse een nestgrootte van 6,7 dieren. Uit de literatuur blijkt dat wildtype FVB/n muizen gemiddeld 9,5 nakomelingen krijgen per nest. Dit is hoger dan gemiddeld in de drie bezochte laboratoria. Gegevens over de fok van wildtype FVB/n muizen in laboratorium 2 gaven een hogere nestgrootte van gemiddeld 11,2 nakomelingen per nest (niet in tabel).

### *Doodgeboren nakomelingen*

De nestgrootte bij de geboorte is gebaseerd op de dieren die levend ter wereld zijn gekomen. Er is echter een percentage dieren dat dood werd geboren (10,7% van de nesten bevatte doodgeboren nakomelingen; gebaseerd op 884 nesten). Uit data analyse van de gegevens van laboratorium 2 bleek dat er significant minder wildtype nesten dode nakomelingen bevatten (3,2% van de nesten bevatte doodgeboren dieren) dan transgene nesten (14,8% van de nesten bevatte doodgeboren dieren, waarvan 4% meer dan 2 dode dieren per nest). Er waren minder nesten met dode dieren met een C57BL/6-

achtergrond, of kruisingen hiervan, dan zonder C57BL/6-achtergrond (resp. 2,6% en 12,2% van de nesten; 805 nesten beschreven). Tevens was er een relatie met het type onderzoek (763 nesten beschreven). In het onderzoek naar geestesziekten was het aantal nesten met dode dieren (17,4%) hoger dan bij immunologisch onderzoek (5,4%). De resultaten staan weergegeven in bijlage 2, tabel 5.

### *Letaliteit*

Het verschil tussen de nestgrootte bij de geboorte en de nestgrootte bij het spenen is gelijk aan het aantal dieren dat in de eerste drie weken na de geboorte is overleden. Dit geeft een indicatie van de levensvatbaarheid van de dieren en/of het voorkomen van kannibalisme.

In de drie laboratoria wordt de nestgrootte op het moment van spenen bijgehouden (zie bijlage 2, tabel 6). Aangezien in laboratorium 1 de nestgrootte bij de geboorte ontbreekt, konden met betrekking tot dit laboratorium geen uitspraken worden gedaan over de sterfte van de dieren in de eerste drie weken. Voor de laboratoria 2 en 3 zijn na data analyse, significante verschillen in letaliteit tussen de verschillende typen onderzoek gevonden (772 nesten beschreven). Kankeronderzoek had een hoger aantal nesten met sterfte (28%) in de eerste drie weken na de geboorte dan onderzoek naar hart- en vaatziekten (4,7%). Immunologisch onderzoek had een hogere letaliteit dan onderzoek naar geestesziekten (resp. in 21,6% en 11,5%). Ook bleken er verschillen in letaliteit te zijn tussen de gebruikte stammen. Van muizen met een FVB/n achtergrond, of kruisingen hiervan, stierven in de eerste drie weken minder dieren dan van muizen die behoren tot een andere stam (resp. 19,8% en 18,8%). Dit komt overeen met gegevens van wildtype dieren in laboratoria 2 en 3. Controledieren in laboratorium 2 met een FVB/n achtergrond hadden een letaliteit van 0,3 jongen per nest. Gegevens van kruisingen met C57BL/6 dieren in laboratorium 3, lieten een letaliteit zien van 1,4 jongen per nest in de eerste drie weken.

### *Gedode dieren bij het spenen*

In de drie laboratoria wordt een aantal dieren bij het spenen gedood. Er zijn een aantal criteria, volgens dierversorgers en onderzoekers, op basis waarvan de keuze voor het doden wordt gemaakt, te weten:

- Selectie op wildtype. Voor het onderzoek zijn de transgene of knock-out dieren nodig. De wildtype littermates (= jongen uit hetzelfde nest die niet transgeen of knock-out zijn) worden in een aantal gevallen als controle gebruikt, of worden gedood. Soms wordt er verder mee gefokt. Dit verschilt per type onderzoek.
- Selectie op geslacht. Soms is er een voorkeur voor mannelijke dieren, omdat wordt aangenomen dat hormoonschommelingen bij de vrouwtjes van invloed zouden kunnen zijn op de uitkomst van het experiment. In dat geval worden de vrouwtjes na het spenen gedood. In andere gevallen gebruikt men bij voorkeur vrouwelijke dieren. De mannelijke dieren worden niet gedood, maar ingezet voor andere experimenten.
- Overschot. Soms worden hele nesten gedood, omdat er een overschot aan dieren is gefokt. Een overschot aan dieren kan ontstaan als er op korte termijn veel dieren nodig zijn voor het onderzoek, of wanneer bekend is dat de dieren weinig nakomelingen krijgen. Er worden dan veel fokken tegelijkertijd ingezet. Als de fok onverwacht tot grote nesten leidt, dan is er een overschot aan dieren ontstaan.

Uit data analyse van de gegevens blijkt dat er meer vrouwelijke dieren werden afgemaakt dan mannelijke dieren (zie tabel 7, bijlage 2). Gemiddeld werden in 27,6% van de nesten vrouwen en in 4,4% van de nesten mannen gedood (1516 nesten beschreven). Daarnaast werden minder wildtype muizen afgemaakt dan gemodificeerde muizen (1,8% resp. 34,2%, 886 nesten beschreven). Wildtype littermates, werden over het algemeen wel afgevoerd. Uit de gegevens blijkt ook dat bij onderzoek naar geestesziekten en naar fysiologie meer dieren werden afgemaakt bij het spenen dan bij onderzoek naar kanker, immunologie of hart- en vaatziekten (768 nesten beschreven). Er worden in laboratorium 3 geen dieren afgevoerd bij het spenen. De selectie vindt daar op een later tijdstip plaats.

### *Dode dieren drie weken na het spenen*

In laboratorium 3 wordt het aantal dieren dat tussen spenen en vier weken na spenen is gestorven genoteerd (zie tabel 8, bijlage 2). Uit de data-analyse bleek dat in 18,6% van de nesten dieren overleden waren (75 nesten beschreven). Deze dieren kunnen spontaan zijn doodgegaan, maar ze kunnen ook zijn afgemaakt. De hoogste sterfte kwam voor bij onderzoek naar fysiologie en metabolisme (in 71,4% van de nesten zijn dieren gestorven, waarvan in 57% meer dan 2 dieren per nest), terwijl bij hart- en vaatziekten de sterfte het laagst was (2%). Dit werd mogelijk mede veroorzaakt door het feit dat bij fysiologie de dieren op een jongere leeftijd ziekteverschijnselen gaan vertonen en eerder in experiment kunnen worden ingezet.

### *Totaal percentage dode dieren*

#### *Aandachtspunt 8*

*Er worden 3,6 maal zoveel jongen van genetisch gemodificeerde ouderdieren doodgeboren als van niet genetisch gemodificeerde ouderdieren. Bovendien gaan 2,3 keer zoveel jongen van genetisch gemodificeerde ouderdieren dood tussen geboorte en spenen, als jongen van niet genetisch gemodificeerde ouderdieren.*

Uit data analyse van de gegevens van de laboratoria 2 en 3 blijkt dat veel dieren doodgingen of gedood werden tijdens of na de geboorte. Over laboratorium 1 kon geen uitspraak worden gedaan, omdat hier alleen gegevens op speenleeftijd bekend zijn. Er was meer sterfte onder de nakomelingen van genetisch gemodificeerde dieren dan onder nakomelingen van wildtype dieren:

|                                   | Gemodificeerde dieren | Wildtype dieren |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Aantal geboren dieren             | 6350                  | 1549            |
| Doodgeboren nakomelingen          | 301                   | 20              |
| Letaliteit (in de eerste 3 weken) | 282                   | 66              |
| Gedood bij spenen                 | 737                   | 56              |

Van de wildtype dieren stierven 20 dieren bij de geboorte, 66 in de eerste 3 levensweken en 56 dieren werden gedood bij het spenen. Van de wildtypes gingen dus 142 van de 1549 dieren dood. Dit is 9% van het totaal. In dezelfde periode (januari tot en met juni 1999) zijn 6350 nakomelingen van een of meer genetisch gemodificeerde ouders geboren, verdeeld over 899 nesten. Daarvan zijn er 301 nakomelingen dood geboren. Dit is 3,6 maal hoger dan het aantal doodgeboren wildtype dieren. Daarnaast zijn in de eerste drie levensweken 282 nakomelingen gestorven. Door selectie werden bij het spenen nog eens 737 jonge muizen gedood. In totaal zijn 1320 van de 6350 nakomelingen tijdens of na de geboorte gestorven. Dit is 21% van het totaal. Dit percentage ligt dus 2,3 x hoger dan bij de wildtype dieren die op dezelfde laboratoria worden gefokt. Hierbij dient te worden opgemerkt dat een onbekend deel van de nakomelingen van een of meer gemodificeerde ouders wildtype is. Deze wildtype littermates worden over het algemeen afgemaakt en meegeteld bij het sterftecijfer van de gemodificeerde dieren.

**Conclusie:**

Het zoeken naar de oorzaken van de verhoogde sterfte onder genetisch gemodificeerde dieren is van belang om het sterftcijfer terug te dringen.

*Stereotiep gedrag**Aandachtspunt 9:*

*In onderzoek wordt gebruik gemaakt van diverse muizenstammen. Het genetisch materiaal van deze muizenstammen is niet identiek. Genconstructen komen in verschillende muizenstammen op verschillende wijze tot expressie. Genconstructen die zijn ingebracht in muizenstammen met stereotiep gedrag, leiden mogelijk tot extra welzijnsproblemen.*

Het erfelijk materiaal is een complex systeem waar ingewikkelde interacties plaatsvinden tussen de verschillende genen, noodzakelijk voor een goed functioneren van het organisme. Het effect van een functioneel genconstruct in transgene muizen of de afwezigheid van een functioneel gen in knock-out muizen, varieert in verschillende achtergrondstammen. Met de keuze van de achtergrondstam houdt men daarom rekening met de interactie tussen het genconstruct en de achtergrondstam. De muizenstammen FVB en C57Bl/6 worden vaak gebruikt om founders te maken en om mee te fokken. Uit eigen observatie en uit de praktijkervaring van diervverzorgers bleek dat de stammen FVB en C57Bl/6 stereotiep gedrag vertoonden: de FVB muizen draaiden rondjes in de bak en sprongen tegen de wand en C57Bl/6 muizen sprongen tegen de wand. Het voortdurend draaien of springen in de bak is, volgens diervverzorgers, een welzijnsprobleem, niet alleen voor het dier zelf, maar ook voor de andere dieren in de bak. Daarbij is niet altijd vooraf te voorspellen wat de effecten zullen zijn van de modificatie op gezondheid, welzijn en het gedrag van de muizen. Gedragsafwijkingen ten gevolge van stereotype gedrag en de mogelijke welzijnsproblemen als gevolg van de modificatie kunnen elkaar mogelijk beïnvloeden.

**Conclusie**

Gedragsafwijkingen ten gevolge van stereotiep gedrag en de mogelijke welzijnsproblemen als gevolg van de modificatie kunnen elkaar mogelijk beïnvloeden.

*Mendeliaanse verdeling*

Erfelijke eigenschappen gaan volgens een vaste verdeling over naar de volgende generatie. Deze verdeling wordt ook wel Mendeliaanse verdeling genoemd, naar de ontdekker G. Mendel (1822-1884). De overerving van een bepaalde eigenschap hangt af van de zygotie (= het homozygoot of heterozygoot zijn) van de ouders:

- Een dier is homozygoot voor een bepaalde eigenschap als het deze eigenschap van beide ouders geërfd heeft.
- Een dier is heterozygoot voor een bepaalde eigenschap als het deze eigenschap slechts van een van beide ouders heeft geërfd.

Volgens Mendel gaat de overerving als volgt:

- Als twee homozygote dieren gekruist worden, dan zal naar verwachting 100% van de nakomelingen homozygoot zijn voor deze eigenschap.
- Als twee heterozygote dieren gekruist worden, dan zal naar verwachting 25% van de nakomelingen homozygoot en 50% heterozygoot zijn voor deze eigenschap. Daarnaast zal 25% van de nakomelingen de eigenschap niet hebben (= wildtype).
- Als een homozygoot dier gekruist wordt met een heterozygoot dier, dan zal naar verwachting 50% van de nakomelingen homozygoot en 50% heterozygoot zijn voor deze eigenschap.

Een afwijking van de Mendeliaanse verdeling zegt iets over een afwijkende overlevingskans van de dieren. Bij het uitschakelen van genen, zoals dat bij knock-out muizen gebeurt, is het mogelijk dat het muizenembryo in een vroeg stadium sterft. Meestal is de invloed van een gen zo groot, dat een dier niet functioneert zonder dit gen. Bij heterozygote dieren is een gen op een van de strengen van het chromosoom aanwezig, waardoor de ontwikkeling niet verstoord hoeft te zijn. Als na een aantal kruisingen van bijvoorbeeld twee heterozygote knock-out ouders geen homozygote nakomelingen geboren zijn, dan kan het zijn dat de homozygote nakomelingen tijdens de embryonale ontwikkeling zijn overleden. Het gen is dan homozygoot letaal.

In deze studie zijn 30 verschillende transgene lijnen bestudeerd. Hiervan waren 6 homozygoot letaal. Daarnaast zijn 34 verschillende knock-out lijnen en knock-out kruisingen bestudeerd. Bij 8 lijnen waren geen gegevens beschikbaar over de zygotie. Bij tien knock-out lijnen en knock-out kruisingen bleken geen homozygote nakomelingen voor te komen. Het was bij betreffende onderzoekers bekend dat deze knock-out lijnen homozygoot letaal waren. Bij onderzoek naar het ontstaan van kanker, bij immunologisch onderzoek en bij onderzoek naar fysiologie en metabole processen wordt vaak gebruik gemaakt van genconstructen die homozygoot letaal zijn.

### 2.3 WELZIJN EN NEVENPATHOLOGIE

#### *Aandachtspunt 10:*

*Onderzoekers zijn niet altijd goed op de hoogte van de gezondheid en het welzijn van de gemodificeerde dieren. De onderzoeker ziet de dieren niet regelmatig en laten zieke of dode dieren slechts in weinig gevallen onderzoeken door een patholoog.*

#### *De onderzoeker*

Uit de studie blijkt dat de afstand tussen de onderzoeker en de dieren groot is. De onderzoeker zit in een ander gebouw of een andere ruimte en zal zeker tijdens de fokperiode de dieren niet dagelijks zien. De kennis die aanwezig is bij de dierverzorgers over de fok en de gegevens die in de foklijsten worden genoteerd zijn niet altijd bekend bij de onderzoeker en de onderzoeker weet, bij navraag, niet in alle gevallen een verklaring te geven voor het mogelijk voorkomen van agressief gedrag, sterfte of pathologie.

#### *Pathologisch onderzoek*

In laboratorium 2 gaan dode of zieke dieren slechts in een enkel geval naar de patholoog. In veel gevallen is het stoffelijk overschot al in ontbinding, wat een pathologisch onderzoek onmogelijk maakt. Over het algemeen wordt een pathologisch onderzoek slechts uitgevoerd in gevallen waar ziekte of overlijden structureel bij een foklijn voorkomt. De keuze blijkt te liggen bij de dierverzorgers of de onderzoeker. De gangbare pathologische screening bestaat uit een macroscopisch, microbiologisch en parasitologisch onderzoek. Dit is echter onvoldoende om een uitspraak te kunnen doen over de eventuele (neven)pathologische effecten van het genconstruct. Volgens geïnterviewde pathologen is hiertoe een breed histopathologisch onderzoek op een aantal dieren van beide geslachten noodzakelijk. Dat dit niet gebeurt heeft twee oorzaken. Ten eerste vinden onderzoekers een breed pathologisch onderzoek niet altijd zinvol. Naar de mening van pathologen en uit reacties tijdens de workshop blijkt dat onderzoekers vaak slechts geïnteresseerd zijn in het eigen onderzoeksgebied en daarbij vergeten dat een organisme in zijn geheel bekeken moet worden, omdat de verschillende organen en systemen niet onafhankelijk van elkaar functioneren. Ten tweede is een standaard histopathologisch onderzoek duur en tijdrovend en heeft daarom geen prioriteit (zie ook bijlage 5). In een studie van Cardiff *et al.* (2000) wordt eveneens het belang van het inschakelen van een patholoog bij biotechnologisch onderzoek onderkend.

### **Conclusie**

Nevenpathologie wordt niet structureel en volledig onderzocht. Zieke en dode dieren moeten in alle gevallen worden onderzocht door een patholoog. Wil men een goed inzicht verkrijgen in de mogelijke nevenpathologie, veroorzaakt door genetische modificatie, dan is een histopathologisch standaardonderzoek van iedere nieuwe lijn noodzakelijk. Hiertoe worden een aantal dieren gedood. In het kader van de vermindering van het aantal dieren voor dierexperimenteel onderzoek is dit minder wenselijk. Men zou zich moeten beperken tot surplusdieren of, indien de aard van het onderzoek dit toelaat, tot dieren die al in onderzoek zijn geweest (Zie verder bijlage 4). De resultaten van pathologisch onderzoek moeten toegankelijk zijn voor de onderzoeker, de Dierexperimentencommissies (DEC) en de Commissie Biotechnologie bij Dieren in het geval er een vervolgaanvraag wordt ingediend, teneinde maximaal van voortschrijdend inzicht gebruik te kunnen maken.

## **2.4 WELZIJN EN MANAGEMENT**

### *Werkdruk*

#### *Aandachtspunt 11:*

*Door de hoge werkdruk bij de diervverzorgers, worden de dieren slechts een of twee keer per week gecontroleerd. Tevens is het zicht in de bakken onvoldoende als gevolg van de positie van de waternippel, voorwerpen in de bak (tissues, doosjes) en door het feit dat de bakken hoog worden opgestapeld.*

Steeds meer wordt er in het biomedisch onderzoek gebruik gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren. Om aan deze vraag te voldoen neemt de fok sterk toe. Diervverzorgers hebben een verantwoordelijke taak in het verzorgen van de toenemende stroom genetisch gemodificeerde dieren, het schoonhouden van de ruimtes, het geven van rondleidingen en onderwijs, het noteren van gegevens in verband met Good Laboratory Practice, het houden van intakegesprekken met nieuwe onderzoekers en het uitvoeren van de diverse biotechnische handelingen in het kader van het onderzoek. De werkdruk staat niet toe om de fokbakken iedere dag goed te controleren (dat wil zeggen de bakken uit de schap halen en in de bak kijken) om eventuele welzijnsproblemen te ontdekken. De fokken worden een keer per week overgezet en, als de jongen oud genoeg zijn, later in de week gespeend. Op deze momenten haalt de diervverzorger de bak uit de schap en hanteert de dieren. Dit geeft hem de gelegenheid om te zien of de dieren gezond zijn, een normaal uiterlijk hebben, de jongen voldoende zogen bij de moeder en of zich dode dieren in de bak bevinden. Worden er zieke dieren aangetroffen, dan worden de onderzoeker en de weekenddienst op de hoogte gesteld. Deze controle vindt een tot twee maal per week plaats. Op andere momenten van de week is een goede controle niet mogelijk. De bakken zijn dusdanig geplaatst in de schappen dat het niet goed mogelijk is alle dieren in de bak te zien, zonder de bak uit de schap te halen. De bakken worden als gevolg van ruimtegebrek tot grote hoogte op de schappen gezet. Het vooraanzicht wordt bemoeilijkt door de waternippel, het bovenaanzicht wordt bemoeilijkt door de ruif met voedselbrokjes en, als er een doosje en tissues in de bak geplaatst zijn als kooiverrijking, dan zijn de dieren vaak volledig uit het zicht. Het gevolg is dat zieke en dode dieren niet direct opgemerkt worden.

### **Conclusie**

Door de werkdruk en de opstelling/inrichting van de bakken hebben diervverzorgers geen tijd om iedere dag het welzijn van de dieren te controleren. Aanpassingen aan de bakken zelf of wijzigingen in de positie van de bakken kan helpen om beter zicht te krijgen op de dieren in de bakken. De kwaliteit van de welzijnscontrole mag niet in gevaar komen als gevolg van een te hoge werkdruk. Het management draagt hiervoor de verantwoording.

## Ongerief

### *Aandachtspunt 12:*

*Het ongerief wordt door onderzoekers gescoord. Onderzoekers zijn niet getraind in het herkennen van gezondheid- en welzijnsproblemen bij dieren.*

In een van de drie laboratoria wordt een centraal databestand bijgehouden. In dit bestand staat onder meer hoeveel ongerief de dieren tijdens hun leven hebben geleden. De mate van ongerief is ingedeeld in 6 klassen; gering, gering/matig, matig, matig/ernstig, ernstig en zeer ernstig. De mate van het geleden ongerief wordt bepaald nadat een dier is overleden, of is afgemaakt. De gegevens hebben betrekking op dieren die gebruikt zijn voor de fok, maar ook op dieren die ziek zijn geweest (al dan niet als gevolg van het transgen) en op dieren die gebruikt zijn voor verdere experimenten. Het ongerief slaat dus niet uitsluitend op het transgeen of knock-out zijn.

Bijna alle muizen hebben minstens gering ongerief geleden, omdat er een klein stukje van hun staart is geknipt. Door analyse van het erfelijk materiaal uit de staartpunt wordt bepaald of de modificatie geslaagd is.

Op basis van de gegevens uit het centrale databestand blijkt dat het geleden ongerief in het betreffende laboratorium tussen gering en gering/matig varieert. Uit eigen analyse van de gegevens blijkt dat er een relatie is tussen ongerief en het veranderen van het erfelijk materiaal (946 nesten beschreven). Transgenen en knock-outs hebben gemiddeld meer ongerief geleden dan wildtype dieren. Daarnaast hadden knock-outs meer ongerief dan transgenen of kruisingen tussen knock-outs en transgenen. Het geleden ongerief was het hoogst bij het kankeronderzoek (593 nesten beschreven). Dit is inherent aan het type onderzoek, omdat het ontstaan van tumoren gepaard kan gaan met veel ongerief. Desondanks was het gemiddelde ongerief bij dit type onderzoek in dit laboratorium laag. Dit neemt echter niet weg dat er ook uitschieters waren, die niet moeten worden verwaarloosd.

De mate van het geleden ongerief wordt door de onderzoekers beoordeeld. Onderzoekers zijn niet opgeleid om het geleden ongerief te kunnen schatten. In interviews kwam naar voren dat in de praktijk de gegevens over het ongerief variabel zijn en niet altijd juist ingeschat.

Het blijkt bovendien dat het databestand niet volledig was; bepaalde gegevens over het ongerief ontbraken. Een aantal onderzoekers heeft in interviews te kennen gegeven dat zij in een aantal gevallen ernstig of zelfs zeer ernstig ongerief hadden waargenomen, terwijl deze gegevens niet in het bestand waren terug te vinden.

### **Conclusie**

Het geregistreerde, gemiddelde geleden ongerief is gering tot gering/matig. Echter, het geraadpleegde databestand was niet volledig en onderzoekers zijn niet opgeleid om het geleden ongerief te kunnen schatten. Uit eigen analyse van de gegevens blijkt dat er een relatie is tussen ongerief en het veranderen van het erfelijk materiaal. Transgenen en knock-outs hebben gemiddeld meer ongerief geleden dan wildtype dieren.

### **Conclusie**

Ongerief wordt gescoord, maar deze score is niet gestandaardiseerd. Het beoordelen van het geleden ongerief dient gestandaardiseerd te worden. Het beoordelen van de mate van ongerief dient niet te worden uitgevoerd door hiertoe onvoldoende opgeleide onderzoekers, maar door ter zake deskundigen (welzijnsonderzoekers, pathologen) om consistentie te waarborgen.

## Registratie

### *Aandachtspunt 13:*

*Alle handelingen met betrekking tot het maken en het fokken van genetisch gemodificeerde dieren zijn gericht op het beantwoorden van een wetenschappelijke vraag. Het registreren van alle dieren betrokken bij genetische modificatie geeft een beter beeld van het aantal gebruikte dieren.*

Genetisch gemodificeerde dieren verschillen van gewone inteeltstammen, in de zin dat er eerst een founder gemaakt moet worden, waarna vervolgens in een fokprogramma een stabiele founderlijn opgezet moet worden. Het maken van een founder kost veel dieren, te weten embryodonoren, draagmoeders, dekmannetjes, gevasectomeerde mannetjes en de wildtype littermates. Er zijn tientallen tot honderden dieren nodig om een geslaagde founder te krijgen. In een aantal gevallen wordt er enkele generaties doorgefokt met de lijn, omdat met een andere achtergrondstam wenst of omdat de lijn in de eerste generaties niet stabiel is.

### **Conclusie:**

Het maken en het fokken van genetisch gemodificeerde dieren moet beschouwd worden als een dierproef en alle dieren gebruikt voor het maken en fokken van genetisch gemodificeerde dieren dienen geregistreerd te worden als proefdier, omdat alle handelingen gericht zijn op het beantwoorden van een wetenschappelijke vraag.

## Monitoring

Een goede welzijnsmonitor kost tijd en vereist deskundigheid en moet daarom worden uitgevoerd door een hiertoe speciaal aangesteld welzijnsteam. De verdere taakomschrijving van het welzijnsteam en de bepaling van de te hanteren welzijnsriteria moeten nog nader ingevuld worden. Uit deze studie zijn een aantal aandachtspunten naar voren gekomen, te weten:

- De ouders en de jongen moeten dagelijks gecontroleerd worden op uiterlijk, fitness, wonden, sterfte en afwijkende gedragskenmerken.
- Er moet rekening gehouden worden met de invloed van het genconstruct op de diverse ontwikkelingsstadia.
- Het zorggedrag moet eenmaal per week, bij het overzetten van de fok, gecontroleerd worden.
- Het gewichtsverloop moet als volgt bepaald worden. Bij bestaande lijnen is de leeftijd waarop de dieren gespeend worden een indicatie van de groeicurve van de jongen. Bij nieuwe lijnen moeten de jongen gewogen worden in week 3, 4, 5, 7 en 9.
- Zieke of dode dieren moeten door een patholoog onderzocht worden, om structurele problemen met de betreffende fok direct te onderkennen.
- Nieuwe lijnen moeten een standaard histopathologisch onderzoek ondergaan.
- De welzijnsmedewerker en de patholoog rapporteren alle gegevens met betrekking tot het maken, de fok, de founderselectie en het experiment in een centraal databestand, houden een welzijnsdagboek bij en houden contact met de onderzoekers.

Volgens diervorzorgers is de keerzijde van een regelmatige welzijnsmonitor het feit dat de dieren vaker zullen worden gehanteerd. Daarom moet een aanvaardbaar compromis gevonden worden tussen een goede welzijnsmonitor en verhoogde stress bij de dieren.

Aanbevolen wordt deze punten op te nemen in een nader uit te werken welzijnsmonitor.



## Toelichting

### *Lichaamsgewicht*

Uit de workshop kwam naar voren dat verandering van het lichaamsgewicht een goede parameter is voor het welzijn van muizen. In geval van ziekte neemt het gewicht van muizen al af, nog voor het dier daadwerkelijk ziekteverschijnselen gaat vertonen. Ook afwijkingen in de microbiologische status van dieren die onder SPF (Specified Pathogen Free) omstandigheden zijn gehuisvest, neemt het lichaamsgewicht af. Toch wordt lichaamsgewicht niet standaard bepaald. Een aantal onderzoekers weegt de dieren wel systematisch, maar dit heeft meestal te maken met het betreffende experiment. In de meeste gevallen wordt een afname in het gewicht door de diervverzorgers 'op het oog' waargenomen.

Pups die achterblijven in hun groei worden later gespeend, om de dieren meer tijd te geven de groeiachterstand in te halen. De leeftijd op het moment van spenen is dan een benadering van de nestspecifieke groeisnelheid.

Voor dit onderzoek zijn in laboratorium 3 per lijn muizen van verschillende transgene en knock-out lijnen gewogen in de leeftijd van 3, 4, 5, 7, 9 en 11 weken. Van elke transgene of knock-out lijn zijn van ten minste 2 fokbakken (stellen) de nakomelingen gewogen. Er is geen verband gevonden tussen het lichaamsgewicht van de dieren en methode van transgenese, type onderzoek of stam. De gewichten van de dieren in laboratorium 3 komen overeen met de gemiddelde waarden van de controle wildtype dieren (B:CBA x C57Bl/6) in laboratorium 3.

**Het bepalen van het lichaamsgewicht is arbeidsintensief en belastend voor de dieren. Alleen bij het maken van nieuwe transgene of knock-out muizen is het nodig de dieren te wegen, om de invloed van het transgen op de ontwikkeling van de dieren te bepalen. Zeker wanneer verwacht wordt dat de dieren op een bepaald moment in de ontwikkeling ziek zullen worden ten gevolge van het transgen, is het aan te raden de dieren te wegen. Op deze manier kan een inschatting gemaakt worden van het moment van ziek worden, zodat het dier tijdig kan worden gedood. In de overige gevallen is het voldoende om de leeftijd op het moment van spenen te noteren, aangezien dit een redelijke benadering is voor de nestspecifieke groeisnelheid.**

## Toelichting

### *Genconstruct en ontwikkelingsstadia*

Ieder genconstruct beïnvloedt de ontwikkeling van het dier in een specifiek ontwikkelingsstadium en kan met name in dat specifieke stadium tot welzijnsproblemen leiden. Bij het uitvoeren van een welzijnsmonitor moet hiermee rekening worden gehouden. Zo zijn er genconstructen die van invloed zijn op de ontwikkeling van het embryo. De dieren zullen niet geboren worden. Dit blijkt uit de nestgrootte bij de geboorte en uit de afwijking van de mendeliaanse verdeling. Andere genconstructen hebben invloed de ontwikkeling van het dier na de geboorte. Gewichtsverlies en afwijkingen in uiterlijk en gedrag zijn indicaties van welzijnsproblemen in dit stadium. De invloed van genconstructen die gedragsveranderingen veroorzaken zal met name blijken uit het zorggedrag en ander sociaal gedrag. In dat geval moet extra aandacht gegeven worden aan de huisvesting van deze dieren.

## HOOFDSTUK 3 BELEIDSAANBEVELINGEN

Op grond van de bevindingen in dit rapport zijn een aantal slotaanbevelingen geformuleerd, die kunnen worden opgenomen in het beleid en beheer van de betrokken organisaties. Deze studie beoogt met de aanbevelingen een kader te schetsen, waarbinnen een goede welzijnsmonitor kan plaatsvinden. De nadere invulling van de criteria en van de praktische aspecten kan door de betrokken partijen nader uitgewerkt worden.

### WELZIJNSTEAM

De beschikbare gegevens, zoals die zijn verzameld in de drie laboratoria geven onvoldoende inzicht in het welzijn van de genetisch gemodificeerde muizen in de betrokken instituten. Dit is een gevolg van een aantal feiten, te weten:

- Hoewel op grond van de Regeling huisvesting en verzorging proefdieren de dieren dagelijks minimaal 1x moeten worden gecontroleerd, blijkt uit de praktijk dat dierverzorgers, als gevolg van de werkdruk, niet iedere dag het welzijn van de dieren kunnen controleren.
- Onderzoekers zijn niet voldoende op de hoogte van eventuele welzijnsproblemen van hun fokken, zijn geen welzijnsdeskundigen en hebben geen inzicht in eventuele nevenpathologie van het genconstruct.
- Instituten beschikken niet over een centraal databestand waarin data zijn opgeslagen, die geschikt zijn om specifieke welzijnsvragen te beantwoorden.
- Er is geen histopathologisch standaardkennis van nieuwe lijnen.

### AANBEVELING 1 WELZIJNSTEAM

**Ieder onderzoeksinstituut zou een welzijnsteam dienen te installeren, dat bestaat uit een welzijns-medewerker die is belast met de welzijnsmonitor, en een patholoog, die ieder ziek of dood dier onderzoekt en nieuwe lijnen aan een standaard histopathologisch onderzoek onderwerpt.**

### CENTRAAL DATABESTAND

In laboratorium 1 worden de gegevens centraal geregistreerd. Deze registratie is echter niet volledig; gegevens over nestgrootte bij de geboorte en letaliteit ontbreken. Gegevens over ongerief zijn beschikbaar, maar zijn niet gestandaardiseerd. Reconstructie van de longitudinale samenhang (generaties, tijdsverloop) is niet mogelijk op basis van dit databestand.

In laboratorium 2 zijn de fokgegevens niet centraal geregistreerd. Een deel van de informatie is te vinden bij de analist die de founders maakt, een deel staat in de fokboeken, of is te vinden bij de onderzoeker. De pathologische rapporten bevinden zich bij de patholoog of de microbiologisch analist en andere gegevens worden bijgehouden door de administratie van het dierenlaboratorium. De foklijsten verschillen per dierunit en worden niet op gelijke wijze ingevuld. In deze situatie is het niet mogelijk een totaalbeeld te verkrijgen van de fok, omdat niet duidelijk is of alle beschikbare informatie is verzameld. Tevens is het niet mogelijk een longitudinale samenhang (een beeld in de tijd) te construeren van de fokken

### Conclusie

Centrale databestanden ontbreken in de drie laboratoria of zijn niet geschikt om specifieke welzijns-vragen te beantwoorden.

#### **AANBEVELING 2 CENTRAAL DATABESTAND:**

Om inzicht te krijgen in de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde dieren tijdens het maken, de fok en het experiment, moet een instellingsgebonden centraal databestand worden geïnstalleerd. Een centraal databestand moet data verstrekken met betrekking tot:

- a. De biotechnologische handelingen:
  - procedure
  - genconstruct
  - aantal dieren gebruikt
  - aantal founders geboren
  - aantal/percentage founders gekozen voor de fok
  - aantal surplus dieren (wel of niet gemodificeerd)
- b. De fok longitudinaal.
  - biologische status\*
- c. Het experiment:
  - aantallen dieren gebruikt
  - mortaliteit
  - ongeriefscore.
- d. De acquisitie
  - aantal dieren of embryo's elders betrokken
  - mortaliteit bij aankomst
  - mortaliteit in quarantaine
  - genconstruct
  - vergunning- en registratiecodes

De volgende data geven inzicht in de \*biologische status van de genetisch gemodificeerde dieren:

- Nestgrootte bij de geboorte en spenen.
- Sexe/sex ratio
- reproductie
- Gewicht pups uitgedrukt in speenleeftijd. Bij een nieuwe lijn moeten tenminste 2 mannelijke dieren en 2 vrouwelijke dieren gewogen worden in week 3, 4, 5, 7 en 9.
- Gewicht na het spenen
- Morbiditeit (percentage en oorzaak bv. natuurlijke oorzaak, onbekend, kannibalisme, surplus, ziekte)
- Pathologie
- Fysiologie (korte termijn: bv. temperatuur, zweten, speekselvorming, hartslag, lange termijn: bv. endocriene veranderingen, veranderingen in wateropname)
- Uiterlijk (houding, conditie vacht of huid, voortbeweging)
- Gedrag (bv. zorggedrag, agressief of apathisch gedrag)

De data moeten gekoppeld worden aan:

- DEC nummer.
- Naam van het construct.
- De Registratie Dierproeven en Proefdieren van het ministerie van VWS.
- De vergunning van het ministerie van LNV.
- De vergunning van het ministerie van VROM.

**Naschrift:** Nadat het hier beschreven onderzoek heeft plaatsgevonden, heeft de Inspectie van het ministerie van VWS in overleg met de beroepsgroep een 'Code of Practice welzijnsbewaking' opgesteld. Op basis van de recente voorschriften verbonden aan een LNV vergunning (art. 66 GWWD) moeten vergunninghouders een welzijnsdagboek bijhouden zoals omschreven in de 'Code of Practice welzijnsbewaking'. In dit dagboek zijn veel elementen opgenomen zoals genoemd in het bovenstaande voorstel. Welke metingen men echter precies gaat uitvoeren wordt aan het inzicht van de betrokkenen overgelaten. Alhoewel hier veel voor te zeggen is, impliceert dit echter dat er niet op een systematische wijze gegevens worden verzameld en dat dus de dagboeken, noch de instellingen, onderling zijn te vergelijken. Ten tweede rept de Code niet over de noodzaak om de afwijkingen en sterfte van de pups in de eerst drie weken voor het spenen nauwkeurig te registreren en te analyseren. Het is in deze fase dat

**transgene dieren significant slechtere overlevingskansen hebben dan niet transgene dieren. Het is ook een fase die niet in de wettelijke registratie wordt meegenomen. Het zou ons inziens goed zijn voor het onderzoek, de verzorging en de beeldvorming, als observatie en kennisvergaring in de toekomst systematisch over het hele traject wordt uitgevoerd.**

*Op basis van de voorschriften verbonden aan een LNV vergunning (art. 66 GWWD) moeten dieren waarvan de gezondheid of het welzijn ernstig zijn benadeeld onverwijld worden gedood. Van deze dieren moet een pathologierapport worden opgesteld, dat wordt toegevoegd aan welzijnsdagboek*

In onderstaande tabel zijn een aantal beleids- en beheersadviezen geformuleerd, die volgen uit de twee hoofdaanbevelingen en onderverdeeld naar de betrokken partijen.

| <b>HOOFDAANBEVELINGEN</b>   | <b>OVERHEID</b>   | <b>INSTELLINGEN</b>   | <b>BEROEPSGROEPEN</b>   |
|-----------------------------|---|---|---|
| <b>WELZIJNSTEAM</b>         | Ministerie van VWS en LNV: verzorgt regelgeving   | <p>Personele invulling regelen</p> <p>Aanpassingen in transgene unit</p> <p>Slagingskansfactoren optimaliseren</p> <p>Code of Practice/ Dierenwelzijnsbeleidsnotitie implementeren</p> <p>Kosten doorberekenen in projectfinanciering</p> | <p>Code of Practice vaststellen</p> <p>Protocol opstellen</p> <p>Periodieke evaluatie</p> <p>Internationale disseminatie van de bevindingen, terugkoppeling</p> |
| <b>CENTRAAL DATABESTAND</b> | <p>Ministerie van VWS en LNV: regelgeving verzorgen</p> <p>Koppeling met registratiesysteem in ministerie van VWS, LNV, VROM</p> <p>Koppeling met Registratie Dierproef en Proefdier met betrekking tot maken en fokken</p> | <p>Personele invulling realiseren</p> <p>Faciliteiten ter beschikking stellen</p> <p>Terugkoppeling naar DEC</p>  | <p>Format vaststellen</p> <p>Evaluatie</p> <p>Internationale disseminatie van de bevindingen, terugkoppeling</p>  |

## LANDBOUWHUISDIEREN

In het kader van de discussie over landbouwhuisdieren zijn in dit rapport twee hoofdaanbevelingen geformuleerd die van toepassing zijn op alle transgene dieren. Gegevens over de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde dieren moeten worden geregistreerd en toegankelijk zijn voor alle betrokken partijen uit de maatschappij. Deze gegevens zijn onmisbaar om een beter inzicht te krijgen in biologische status en de daarmee samenhangende gezondheids- en welzijnsrisico's van genetisch gemodificeerde landbouwhuisdieren met vergelijkbare genconstructen.

### **Conclusie**

Kennis omtrent de gezondheid- en het welzijn van genetisch gemodificeerde muizen geeft meer inzicht in de gezondheid en het welzijn van genetisch gemodificeerde landbouwhuisdieren. De effecten van een genconstruct op de fysiologie en het gedrag van genetisch gemodificeerde muizen moeten worden geregistreerd, teneinde mogelijke fysiologische en gedragsafwijkingen te kunnen onderkennen bij transgene landbouwhuisdieren.

## BIJLAGE 1 ONDERZOEKSOPZET

In de periode januari 1999 tot en met juli 1999 zijn in drie onderzoeksinstituten in Nederland (laboratoria 1, 2 en 3), alle beschikbare gegevens over de transgene en knock-out foklijnen verzameld, met als doel een vergelijking te maken tussen de transgene, de knock-out en de wildtype controle lijnen. Het betreft informatie over het maken van founders, over de founderselectie, over de fok, over de selectie tijdens het spenen en informatie over de nevenpathologie. Gegevens over het zorggedrag en het gewichtsverloop werden verkregen uit eigen observatie. De vervolghandelingen in de experimentele fase vallen onder de Wet op de dierproeven en daarbij horende gegevens over aantallen, doel en ongerief worden reeds systematisch geregistreerd.

De resultaten van het onderzoek zijn in een tweetal workshops voorgelegd aan een aantal deskundigen uit de wetenschappelijke wereld, aan de onderzoekscoördinatoren van de drie laboratoria, en aan vertegenwoordigers van adviescommissies, de overheid en maatschappelijke organisaties. De conclusies en aanbevelingen die werden voorgedragen, bediscussieerd en onderschreven, zijn in dit rapport verwerkt.

### *Categorieën*

De verschillende data met betrekking tot het maken en fokken van transgene en knock-out lijnen zijn als volgt onderverdeeld:

- Het maken van een founder.
- De founderselectie
- De fok
- De selectie tijdens het spenen
- De nevenpathologie

In deze verschillende categorieën zijn de gemiddelde aantallen en hun standaarddeviatie bepaald en is een aantal, van tevoren door de begeleidingscommissie vastgestelde nulhypotheses, getoetst met behulp van de volgende parameters: slagingskans, nestgrootte, sterfte, selectie na het spenen, ongeriefscore, gewicht, Mendeliaanse verdeling, uiterlijk, zorggedrag en nevenpathologie. Deze parameters zijn gerelateerd aan de methode (micro-injectie of electroporatie), achtergrondstam, type onderzoek, sekse en laboratorium.

## BIJLAGE 2 DATA-ANALYSE

### *Beschrijvingen*

- gemiddelde waarden en spreidingen van aantallen geslaagde transgenen en knock-outs
- nestgrootte en aantallen dieren dood bij geboorte
- letaliteit (verschil nestgrootte bij spenen en bij geboorte)
- aantallen gedode dieren bij spenen (leeftijd ca. 21 dagen)
- aantallen dieren doodgegaan of gedood een maand na spenen (verschil nestgrootte tussen spenen en een maand na spenen)
- ongerief
- zorggedrag
- lichaamsgewicht

### *Nulhypotheses*

- Er is geen verschil tussen transgenen, knock-outs en de controlegroep, ten aanzien van de gekozen parameters.
- De Mendeliaanse verdeling is niet afwijkend (inclusief man:vrouw verhouding).
- Er is geen verschil in nestgrootte, letaliteit, aantallen gedode dieren, ongerief, zorggedrag en gewicht tussen de verschillende methodes, typen onderzoek, stammen, laboratoria en seksen.

Deze nulhypotheses zijn getoetst door middel van niet-parametrische toetsen (Mann-Whitney-U, Kruskal-Wallis of Chi-kwadraat). Bij significante verschillen is met behulp van een Tukey's HSD test bepaald welke groepen deze onderling verschillen vertoonden.

### *Indeling groepen*

De nesten zijn geclusterd in methoden van transgenese (4 groepen), typen van onderzoek (5 groepen), laboratoria (3 groepen), stammen (2 keer 2 groepen) en sekse (2 groepen). De groepen zijn als volgt ingedeeld:

#### Methodes van genetische modificatie

De nesten zijn ingedeeld naar 4 verschillende methodes van transgenese;

- Micro-injectie om transgene dieren te verkrijgen: hieronder vallen alle nesten geboren uit ouders die een of meerdere transgenen hebben en alle kruisingen van transgenen met andere transgenen of met wildtype dieren. De nesten kunnen zowel transgene als niet-transgene (= wildtype littermates) nakomelingen bevatten.
- Embryonale stamceltechnologie om knock-out dieren te verkrijgen: hieronder vallen alle nesten geboren uit ouders waarvan een of meerdere genen zijn uitgeschakeld (= knock-out) en alle kruisingen van knock-outs met andere knock-outs of met wildtype dieren. De nesten kunnen zowel knock-out als wildtype littermates bevatten.
- Kruisingen van transgenen x knock-outs: hieronder vallen alle nesten die geboren zijn uit kruisingen van (meervoudig) transgene dieren met (meervoudig) knock-out dieren. De nesten kunnen zowel genetisch gemodificeerde als wildtype littermates bevatten.
- Wildtypes: dit zijn nesten die geboren zijn uit wildtype ouders en dus geen genetische verandering hebben. Deze dieren worden speciaal gefokt om als controle te dienen of om transgenen of knock-outs mee te kruisen.

#### Type onderzoek

De nesten zijn ingedeeld in 5 typen van onderzoek;

- Onderzoek naar ontstaan en behandeling van kanker.
- Onderzoek naar hart- en vaatziekten.
- Immunologisch onderzoek.



- Onderzoek naar geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel.
- Onderzoek naar fysiologische en metabole processen.

### Stam

Ruim dertig stammen en kruisingen van stammen zijn gebruikt om de genetisch gemodificeerde muizen mee te maken en te fokken. De muizenstammen FVB en C57Bl/6 en kruisingen hiervan worden het meest gebruikt om transgene en knock-out lijnen mee te maken en te fokken. Deze stammen vertonen echter stereotiep gedrag, namelijk draaien en springen in FVB muizen en springen in C57Bl/6 muizen. Om te kijken of een FVB of C57Bl/6 achtergrondstam in genetisch gemodificeerde muizen van invloed was op hun zorggedrag, is het zorggedrag vergeleken tussen dieren met (een kruising van) FVB achtergrond of muizen met (een kruising van) C57Bl/6 achtergrond met dieren met een achtergrond zonder (een kruising van) FVB of C57Bl/6.

De nesten zijn ingedeeld naar 2 series van 2 groepen van genetische achtergrond:

- Wel C57Bl/6-eigenschappen; hieronder vallen alle muizen met een zuivere C57Bl/6 achtergrond en kruisingen hiervan
- Geen C57Bl/6-eigenschappen; hieronder vallen alle muizen met een andere dan C57Bl/6 achtergrond
- Wel FVB/n eigenschappen; hieronder vallen alle muizen met een zuivere FVB/n achtergrond en kruisingen hiervan
- Geen FVB/n eigenschappen; hieronder vallen alle muizen met een andere dan FVB/n achtergrond

### Laboratorium

De waarnemingen zijn ingedeeld in de 3 laboratoria waar ze zijn verzameld.

### Sekse

De muizen zijn ingedeeld in mannelijke en vrouwelijke nakomelingen.

### *Data-analyse*

In tabel 1 staan de verschillen tussen de verschillende variabelen schematisch weergegeven. De groepen die significant van elkaar verschillen zijn in tabel 1 met \* aangegeven. De details van deze verschillen zijn weergegeven in tabel 2 tot en met 8.

|                           | Methode van Transgenese | Type onderzoek | Achtergrondstam |         | Laboratorium | Sekse |
|---------------------------|-------------------------|----------------|-----------------|---------|--------------|-------|
|                           |                         |                | FVB             | C57Bl/6 |              |       |
| Dood geboren              | **                      | **             | n.s.            | *       | -            | -     |
| Nestgrootte               | ***                     | ***            | **              | n.s.    | n.s.         | n.s.  |
| Letaliteit                | n.s.                    | ***            | **              | n.s.    | n.s.         | -     |
| Gedode dieren (21 dagen)  | ***                     | ***            | *               | **      | **           | ***   |
| Dode dieren (21-50 dagen) | n.s.                    | ***            | -               | -       | -            | n.s.  |
| Ongerief                  | ***                     | ***            | -               | -       | -            | n.s.  |
| Zorggedrag                | **                      | **             | n.s.            | **      | -            | -     |
| Gewicht                   | n.s.                    | n.s.           | n.s.            | n.s.    | -            | ***   |
| Nevenpathologie           | n.s.                    | n.s.           | -               | -       | -            | -     |

Tabel 1: overzicht verschillen (n.s. = niet significant; - = niet bepaald; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

|                                       | Gemiddelde gewicht (g.) | Standard error of the mean | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |  |
|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|--|
|                                       |                         |                            |                     | A                        | B | C | D | E |  |
| <i>Methode van transgenese:</i>       |                         |                            |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Knock-outs (A)                      | 20,3                    | 0,473                      | 28                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Transgenen (B)                      | 20,3                    | 0,471                      | 47                  | B                        |   |   |   |   |  |
| - Knock-out x transgeen (C)           | -                       | -                          | 0                   | C                        |   |   |   |   |  |
| - Wildtype (D)                        | -                       | -                          | 0                   | D                        |   |   |   |   |  |
| <i>Type onderzoek:</i>                |                         |                            |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | 19,8                    | 0,446                      | 47                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Immunologie (B)                     | 21,6                    | 1,134                      | 8                   | B                        |   |   |   |   |  |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 21,0                    | 0,596                      | 11                  | C                        |   |   |   |   |  |
| - Geestesziekten (D)                  | -                       | -                          | 0                   | D                        |   |   |   |   |  |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 21,7                    | 1,173                      | 5                   | E                        |   |   |   |   |  |
| <i>Laboratorium:</i>                  |                         |                            |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - 1 (A)                               | -                       | -                          | 0                   | A                        |   |   |   |   |  |
| - 2 (B)                               | -                       | -                          | 0                   | B                        |   |   |   |   |  |
| - 3 (C)                               | 20,3                    | 0,342                      | 75                  | C                        |   |   |   |   |  |
| <i>Sekse:</i>                         |                         |                            |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Mannen (A)                          | 22,3                    | 0,398                      | 37                  | A                        | * |   |   |   |  |
| - Vrouwen (B)                         | 18,4                    | 0,166                      | 38                  | B                        |   |   |   |   |  |

Tabel 2: lichaamsgewichten op een leeftijd van 7 weken

De groepen hebben een letter gekregen (A-E). De laatste kolom fungeert als een kruistabel, waarin de significante verschillen tussen deze groepen zijn weergegeven met een \* .

|                                       | Nesten met gering ongerief (%) <sup>1</sup> | Nesten met meer dan gering ongerief (%) <sup>2</sup> | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |   |
|---------------------------------------|---|--|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|
|                                       |   |  |                     | A                        | B | C | D | E |   |
| <i>Methode van transgenese:</i>       |   |  |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Knock-outs (A)                      | 81,3  | 18,8   | 205                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - Transgenen (B)                      | 89,1  | 10,9   | 469                 | B                        | * |   |   |   |   |
| - Knock-out x transgeen (C)           | 97,9  | 2,1  | 77                  | C                        | * | * |   |   |   |
| - Wildtype (D)                        | 100,0                                       | 0  | 195                 | D                        | * | * |   |   |   |
| <i>Type onderzoek:</i>                |   |  |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | 88,7  | 11,3   | 305                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - Immunologie (B)                     | 96,6  | 3,4  | 108                 | B                        |   |   |   |   |   |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 72,5  | 27,5   | 150                 | C                        | * | * |   |   | * |
| - Geestesziekten (D)                  | -   | -  | 0                   | D                        |   |   |   |   |   |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 100,0                                       | 0  | 30                  | E                        |   |   |   |   |   |
| <i>Laboratorium:</i>                  |   |  |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - 1 (A)                               | 90,4  | 9,6  | 980                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - 2 (B)                               | -   | -  | 0                   | B                        |   |   |   |   |   |
| - 3 (C)                               | -   | -  | 0                   | C                        |   |   |   |   |   |
| <i>Sekse:</i>                         |   |  |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Mannen (A)                          | 91,5  | 8,5  | 1117                | A                        |   |   |   |   |   |
| - Vrouwen (B)                         | 90,4  | 8,6  | 1104                | B                        |   |   |   |   |   |

Tabel 3: mate van geleden ongerief

<sup>1</sup> In deze kolom staat het percentage nesten dat gering ongerief heeft geleden

<sup>2</sup> In deze kolom staat het percentage nesten met meer dan gering ongerief geleden.

|                                       | Gemiddelde nestgrootte bij geboorte | Standard error of the mean | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |   |
|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|
|                                       |                                     |                            |                     | A                        | B | C | D | E |   |
| <i>Methode van transgenese:</i>       |                                     |                            |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Knock-outs (A)                      | 5,3                                 | 0,144                      | 391                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - Transgenen (B)                      | 5,4                                 | 0,194                      | 293                 | B                        |   |   |   |   |   |
| - Knock-out x transgeen (C)           | 6,7                                 | 0,503                      | 45                  | C                        | * |   |   |   |   |
| - Wildtype (D)                        | 8,3                                 | 0,322                      | 141                 | D                        | * | * | * |   |   |
| <i>Type onderzoek:</i>                |                                     |                            |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | 4,3                                 | 0,551                      | 22                  | A                        |   |   |   |   |   |
| - Immunologie (B)                     | 6,0                                 | 0,193                      | 298                 | B                        |   |   |   |   |   |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 6,2                                 | 0,652                      | 28                  | C                        |   |   |   |   |   |
| - Geestesziekten (D)                  | 4,5                                 | 0,166                      | 246                 | D                        |   | * |   |   | * |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 5,8                                 | 0,254                      | 151                 | E                        |   |   |   |   |   |
| <i>Laboratorium:</i>                  |                                     |                            |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - 1 (A)                               | -                                   | -                          | 0                   | A                        |   |   |   |   |   |
| - 2 (B)                               | 6,0                                 | 0,119                      | 815                 | B                        |   |   |   |   |   |
| - 3 (C)                               | 5,2                                 | 0,437                      | 57                  | C                        |   |   |   |   |   |
| <i>Sekse:</i>                         |                                     |                            |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Mannen (A)                          | 2,5                                 | 0,087                      | 413                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - Vrouwen (B)                         | 2,9                                 | 0,251                      | 413                 | B                        |   |   |   |   |   |
| <i>Achtergrondstam:</i>               |                                     |                            |                     |                          |   |   |   |   |   |
| - Wel FVB/n (A)                       | 6,7                                 | 0,226                      | 278                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - Geen FVB/n (B)                      | 5,6                                 | 0,138                      | 520                 | B                        | * |   |   |   |   |
| - Wel C57Bl/6 (A)                     | 5,8                                 | 0,305                      | 112                 | A                        |   |   |   |   |   |
| - Geen C57Bl/6 (B)                    | 6,0                                 | 0,131                      | 683                 | B                        |   |   |   |   |   |

Tabel 4: nestgrootte bij de geboorte

|                                       | Nesten zonder dode dieren (%) <sup>3</sup> | Nesten met 1- 2 dode dieren (%) <sup>4</sup> | Nesten met > 2 dode dieren (%) <sup>5</sup> | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |
|---------------------------------------|--|--|---|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|
|                                       |  |  |   |                     | A                        | B | C | D | E |
| <i>Methode van transgenese:</i>       |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - Knock-outs (A)                      | 88,5                                       | 10,1   | 1,4   | 357                 | A                        |   |   |   |   |
| - Transgenen (B)                      | 85,2                                       | 10,8   | 4,0   | 297                 | B                        |   |   |   |   |
| - Knock-out x transgeen (C)           | 87,1                                       | 12,9   | -   | 31                  | C                        |   |   |   |   |
| - Wildtype (D)                        | 96,8                                       | 3,2  | -   | 190                 | D                        |   | * |   |   |
| <i>Type onderzoek:</i>                |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | -  | -  | -   | 0                   | A                        |   |   |   |   |
| - Immunologie (B)                     | 94,6                                       | 5,0  | 0,4   | 260                 | B                        |   |   |   |   |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 58,3                                       | 33,3   | 8,3   | 12                  | C                        |   |   |   |   |
| - Geestesziekten (D)                  | 82,6                                       | 14,2   | 3,2   | 317                 | D                        |   | * |   |   |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 89,7                                       | 7,5  | 2,9   | 174                 | E                        |   |   |   |   |
| <i>Laboratorium:</i>                  |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - 1 (A)                               | -  | -  | -   | 0                   | A                        |   |   |   |   |
| - 2 (B)                               | 89,3                                       | 8,8  | 1,9   | 884                 | B                        |   |   |   |   |
| - 3 (C)                               | -  | -  | -   | 0                   | C                        |   |   |   |   |
| <i>Achtergrondstam:</i>               |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - Wel FVB/n (A)                       | 89,7                                       | 9,2  | 1,1   | 349                 | A                        |   |   |   |   |
| - Geen FVB/n (B)                      | 88,0                                       | 9,4  | 2,6   | 459                 | B                        |   |   |   |   |
| - Wel C57Bl/6 (A)                     | 97,4                                       | 2,6  | -   | 78                  | A                        |   |   |   |   |
| - Geen C57Bl/6 (B)                    | 87,8                                       | 10,0   | 2,2   | 727                 | B                        | * |   |   |   |

Tabel 5: doodgeboren dieren

<sup>3</sup> In deze kolom staat het percentage nesten zonder doodgeboren dieren.

<sup>4</sup> In deze kolom staat het percentage nesten dat tot 2 doodgeboren nakomelingen heeft.

<sup>5</sup> In deze kolom staat het percentage nesten met meer dan 2 doodgeboren nakomelingen.

|                                       | Nesten zonder dode dieren (%) <sup>6</sup> | Nesten met 1- 2 dode dieren (%) <sup>7</sup> | Nesten met > 2 dode dieren (%) <sup>8</sup> | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |
|---------------------------------------|--|--|---|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|
|                                       |  |  |   |                     | A                        | B | C | D | E |
| <i>Methoden van transgenese:</i>      |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - Knock-outs (A)                      | 82,5                                       | 14,0   | 3,5   | 371                 | A                        |   |   |   |   |
| - Transgenen (B)                      | 86,5                                       | 10,5   | 3,1   | 325                 | B                        |   |   |   |   |
| - Knock-out x transgeen (C)           | 81,5                                       | 14,8   | 3,7   | 27                  | C                        |   |   |   |   |
| - Wildtype (D)                        | 89,1                                       | 8,6  | 2,3   | 175                 | D                        |   |   |   |   |
| <i>Type onderzoek:</i>                |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | 95,3                                       | 4,7  | -   | 43                  | A                        |   |   |   |   |
| - Immunologie (B)                     | 78,5                                       | 16,5   | 5,1   | 237                 | B                        |   |   |   |   |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 72,0                                       | 16,0   | 12,0  | 25                  | C                        | * |   |   |   |
| - Geestesziekten (D)                  | 88,6                                       | 9,8  | 1,7   | 297                 | D                        |   | * |   |   |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 87,6                                       | 9,4  | 2,9   | 170                 | E                        |   |   |   |   |
| <i>Laboratorium:</i>                  |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - 1 (A)                               | -  | -  | -   | 0                   | A                        |   |   |   |   |
| - 2 (B)                               | 84,9                                       | 12,0   | 3,0   | 822                 | B                        |   |   |   |   |
| - 3 (C)                               | 88,2                                       | 7,9  | 3,9   | 76                  | C                        |   |   |   |   |
| <i>Achtergrondstam:</i>               |  |  |   |                     |                          |   |   |   |   |
| - Wel FVB/n (A)                       | 90,2                                       | 8,6  | 1,2   | 338                 | A                        |   |   |   |   |
| - Geen FVB/n (B)                      | 81,2                                       | 13,9   | 4,9   | 474                 | B                        | * |   |   |   |
| - Wel C57Bl/6 (A)                     | 89,3                                       | 8,3  | 2,5   | 121                 | A                        |   |   |   |   |
| - Geen C57Bl/6 (B)                    | 84,2                                       | 12,4   | 3,5   | 688                 | B                        |   |   |   |   |

Tabel 6: letaliteit in de eerste 3 weken

<sup>6</sup> In deze kolom staat het percentage nesten zonder letaliteit in de eerste 3 weken.

<sup>7</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan 1 tot 2 nakomelingen sterven in de eerste 3 weken.

<sup>8</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan meer dan 2 dieren sterven in de eerste 3 weken.

|                                       | Nesten zonder dode dieren (%) <sup>9</sup> | Nesten met 1-2 dode dieren (%) <sup>10</sup> | Nesten met > 2 dode dieren (%) <sup>11</sup> | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |  |
|---------------------------------------|--|--|--|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|--|
|                                       |  |  |  |                     | A                        | B | C | D | E |  |
| <i>Methode van transgenese:</i>       |  |  |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Knock-outs (A)                      | 81,4                                       | 9,0  | 9,6  | 376                 | A                        |   |   |   |   |  |
| - Transgenen (B)                      | 67,6                                       | 20,6   | 11,7   | 315                 | B                        |   |   |   |   |  |
| - Knock-out x transgeen (C)           | 48,1                                       | 331,3  | 18,5   | 27                  | C                        |   |   |   |   |  |
| - Wildtype (D)                        | 98,2                                       | 1,2  | 0,6  | 168                 | D                        | * | * | * |   |  |
| <i>Type onderzoek:</i>                |  |  |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | 100,0                                      | -  | -  | 53                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Immunologie (B)                     | 88,7                                       | 4,0  | 7,3  | 248                 | B                        |   |   |   |   |  |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 96,0                                       | 4,0  | -  | 25                  | C                        |   |   |   |   |  |
| - Geestesziekten (D)                  | 61,0                                       | 24,1   | 14,9   | 282                 | D                        | * | * | * |   |  |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 69,4                                       | 18,8   | 11,9   | 160                 | E                        | * |   |   |   |  |
| <i>Laboratorium:</i>                  |  |  |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - 1 (A)                               | -  | -  | -  | 0                   | A                        |   |   |   |   |  |
| - 2 (B)                               | 76,6                                       | 13,6   | 9,8  | 809                 | B                        |   |   |   |   |  |
| - 3 (C)                               | 100,0                                      | -  | -  | 85                  | C                        |   | * |   |   |  |
| <i>Sekse:</i>                         |  |  |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Mannen (A)                          | 95,6                                       | 3,0  | 1,4  | 777                 | A                        |   |   |   |   |  |
| - Vrouwen (B)                         | 72,4                                       | 16,8   | 10,8   | 739                 | B                        | * |   |   |   |  |
| <i>Achtergrondstam:</i>               |  |  |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Wel FVB/n (A)                       | 85,2                                       | 9,0  | 5,9  | 324                 | A                        |   |   |   |   |  |
| - Geen FVB/n (B)                      | 77,8                                       | 13,9   | 8,2  | 474                 | B                        | * |   |   |   |  |
| - Wel C57Bl/6 (A)                     | 97,5                                       | 2,5  | -  | 122                 | A                        |   |   |   |   |  |
| - Geen C57Bl/6 (B)                    | 77,7                                       | 13,7   | 8,6  | 673                 | B                        |   |   |   |   |  |

Tabel 7: dieren gedood bij het spenen (leeftijd 3 weken)

<sup>9</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan geen dieren worden gedood op speenleeftijd.

<sup>10</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan 1 tot 2 dieren worden gedood op speenleeftijd.

<sup>11</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan meer dan 2 dieren worden gedood op speenleeftijd.

|                                       | Nesten zonder dode dieren (%) <sup>12</sup> | Nesten met 1- 2 dode dieren (%) <sup>13</sup> | Nesten met > 2 dode dieren (%) <sup>14</sup> | Aantal waarnemingen | Significante verschillen |   |   |   |   |  |
|---------------------------------------|---|---|--|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|--|
|                                       |   |   |  |                     | A                        | B | C | D | E |  |
| <i>Methoden van transgenese:</i>      |   |   |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Knock-outs (A)                      | 82,4  | 5,9   | 11,8   | 34                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Transgenen (B)                      | 80,5  | 7,3   | 12,2   | 41                  | B                        |   |   |   |   |  |
| - Knock-out x transgeen (C)           | -   | -   | -  | 0                   | C                        |   |   |   |   |  |
| - Wildtype (D)                        | -   | -   | -  | 0                   | D                        |   |   |   |   |  |
| <i>Type onderzoek:</i>                |   |   |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Hart- en vaatziekten (A)            | 98,0  | 2,0   | -  | 50                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Immunologie (B)                     | 50,0  | 50,0  | -  | 2                   | B                        |   |   |   |   |  |
| - Kankeronderzoek (C)                 | 50,0  | 16,7  | 33,3   | 12                  | C                        | * |   |   |   |  |
| - Geestesziekten (D)                  | -   | -   | -  | 0                   | D                        |   |   |   |   |  |
| - Fysiologie & metabole processen (E) | 28,6  | 14,3  | 57,1   | 7                   | E                        | * | * | * |   |  |
| <i>Laboratorium:</i>                  |   |   |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - 1 (A)                               | -   | -   | -  | 0                   | A                        |   |   |   |   |  |
| - 2 (B)                               | -   | -   | -  | 0                   | B                        |   |   |   |   |  |
| - 3 (C)                               | 81,3  | 6,7   | 12,0   | 75                  | C                        |   |   |   |   |  |
| <i>Sekse:</i>                         |   |   |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Mannen (A)                          | 96,0  | 4,0   | -  | 99                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Vrouwen (B)                         | 93,9  | 4,0   | 2,0  | 99                  | B                        |   |   |   |   |  |
| <i>Achtergrondstam:</i>               |   |   |  |                     |                          |   |   |   |   |  |
| - Wel FVB/n (A)                       | -   | -   | -  | 0                   | A                        |   |   |   |   |  |
| - Geen FVB/n (B)                      | 74,4  | 9,3   | 16,3   | 43                  | B                        |   |   |   |   |  |
| - Wel C57Bl/6 (A)                     | 74,4  | 9,3   | 16,3   | 43                  | A                        |   |   |   |   |  |
| - Geen C57Bl/6 (B)                    | -   | -   | -  | 0                   | B                        |   |   |   |   |  |

Tabel 8: dode dieren maand na spenen (doodgegaan/doodgemaakt)

<sup>12</sup> In deze kolom staat het percentage nesten zonder gestorven/gedode dieren in de maand na het spenen.

<sup>13</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan tot 2 dieren gestorven/gedood zijn in de maand na het spenen.

<sup>14</sup> In deze kolom staat het percentage nesten waarvan meer dan 2 dieren gestorven/gedood zijn in de maand na het spenen.

## **BIJLAGE 3 HET MAKEN VAN EEN GENETISCH GEMODIFICEERD DIER**

Een genetisch gemodificeerd dier is een dier waarvan het erfelijk materiaal is veranderd. Er zijn verschillende manieren om transgene dieren te maken. In dit rapport zullen de twee meest gebruikte methoden, micro-injectie en de embryonale stamcel (ES) technologie, besproken worden. De genoemde getallen zijn afkomstig van laboratorium 2.

### *Micro-injectie*

Micro-injectie is het injecteren van DNA (= erfelijk materiaal) in een bevruchte eicel. Hiervoor wordt de onderstaande procedure gevolgd (zie figuur 1).

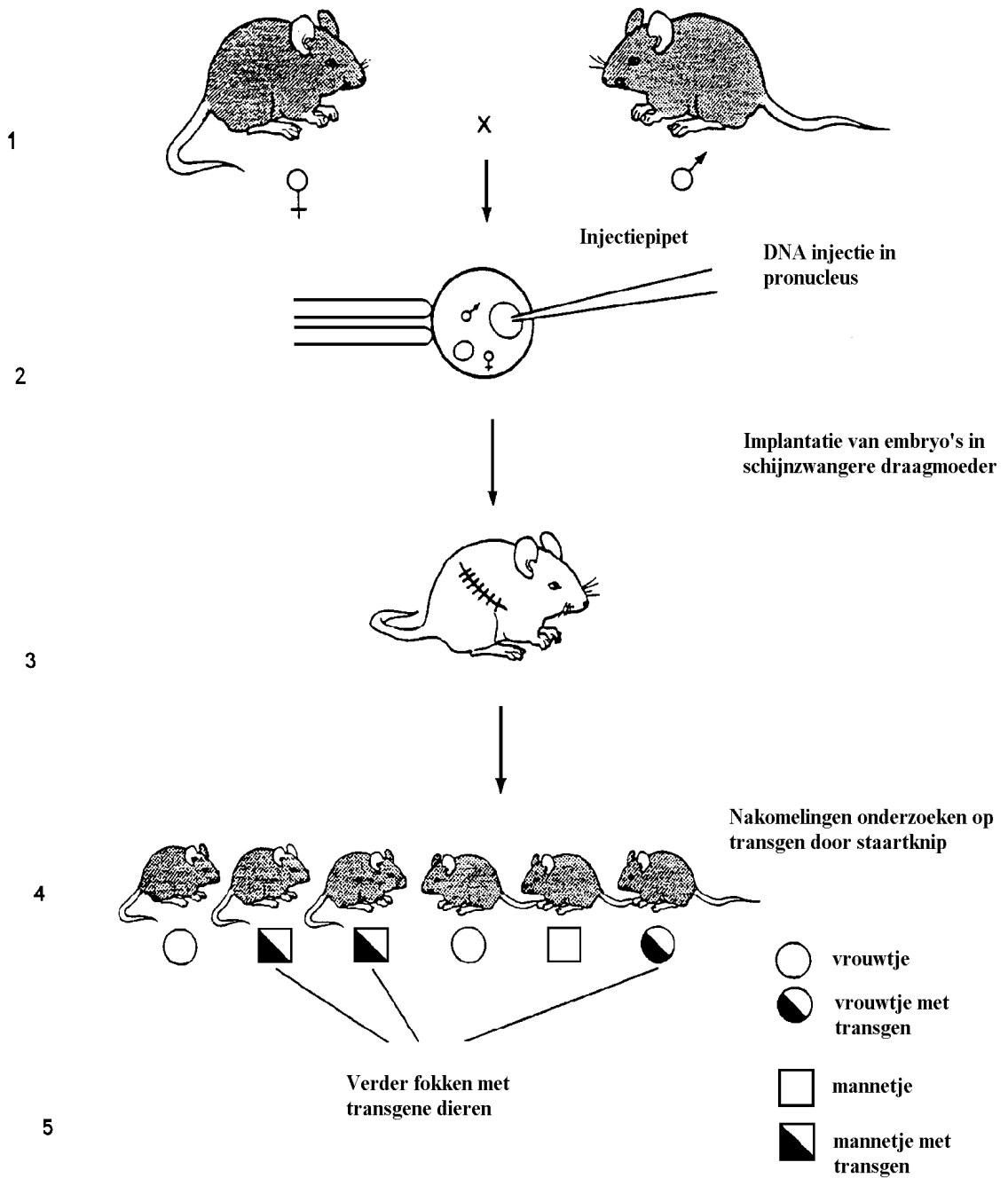
1. Allereerst zijn 10 tot 15 vrouwelijke muizen nodig voor het verkrijgen van bevruchte eicellen. Deze muizen worden behandeld met hormonen om een grotere hoeveelheid eicellen te laten vrijkomen (= superovulatie). Per vrouwtje is een mannelijke muis (= dekman) nodig om de eicellen te bevruchten. Het aantal vrouwtjes hangt af van de gebruikte stam (vergelijkbaar met een muizenras). Kiest men voor de stammen B6CBAF1 of FVB/n, dan zijn 10 vrouwtjes nodig die in totaal 300 bevruchte eicellen leveren. Als gekozen is voor vrouwtje van de C57BL/6-stam, dan zijn 15 dieren nodig die in totaal 250 bevruchte eicellen leveren. Tegelijkertijd worden 3-5 andere vrouwelijke muizen samengebracht met evenveel gevasectomeerde (= gesteriliseerde) mannetjes. Als deze muizen paren worden de vrouwtjes schijnzwanger. Deze dieren worden later in de procedure gebruikt als fostermoeders (= draagmoeders).
2. De volgende dag worden de vrouwelijke eiceldonoren gedood. De bevruchte eicellen worden uit de dieren gehaald. Met een micro-injector worden stukjes erfelijk materiaal (= transgenen) in de cellen gespoten.
3. De cellen worden door een operatie in de draagmoeders gebracht. Per draagmoeder worden 10 tot 30 (gemiddeld 15) bevruchte eicellen geplaatst.
4. 19 tot 21 dagen later worden de nakomelingen geboren. Elk nest bestaat uit transgene pups, maar ook uit 'normale' muizen (= wildtype muizen) die het transgen niet in zich dragen. Van elke jonge muis wordt een stukje van de staart geknipt. Met behulp van een DNA-test op het erfelijk materiaal uit de staartpunt wordt bepaald welke dieren het transgen bij zich dragen. Deze eerste transgene dieren worden founders (= stamouders) genoemd. Er wordt gestreefd naar de productie van 3 founders per injectieronde, waarna een selectie gemaakt wordt.
5. Met de voor het onderzoek meest geschikte founders wordt verder gefokt om een nieuwe muizenlijn op te zetten.

### *Embryonale stamceltechnologie*

Embryonale stamcellen (ES-cellen) zijn ongedifferentieerde embryonale cellen die kunnen worden gekweekt zonder het vermogen te verliezen om aan de embryonale ontwikkeling deel te nemen. Het is mogelijk om ES-cellen te maken waarin erfelijk materiaal (= transgen) op een vooraf vastgestelde plaats in het DNA wordt ingebracht. Dit wordt homologe recombinatie genoemd. Op deze manier kan een functioneel gen worden vervangen door een transgen, waardoor een zogenaamde knock-out muis ontstaat. Hiertoe wordt de onderstaande procedure uitgevoerd (zie figuur 2).

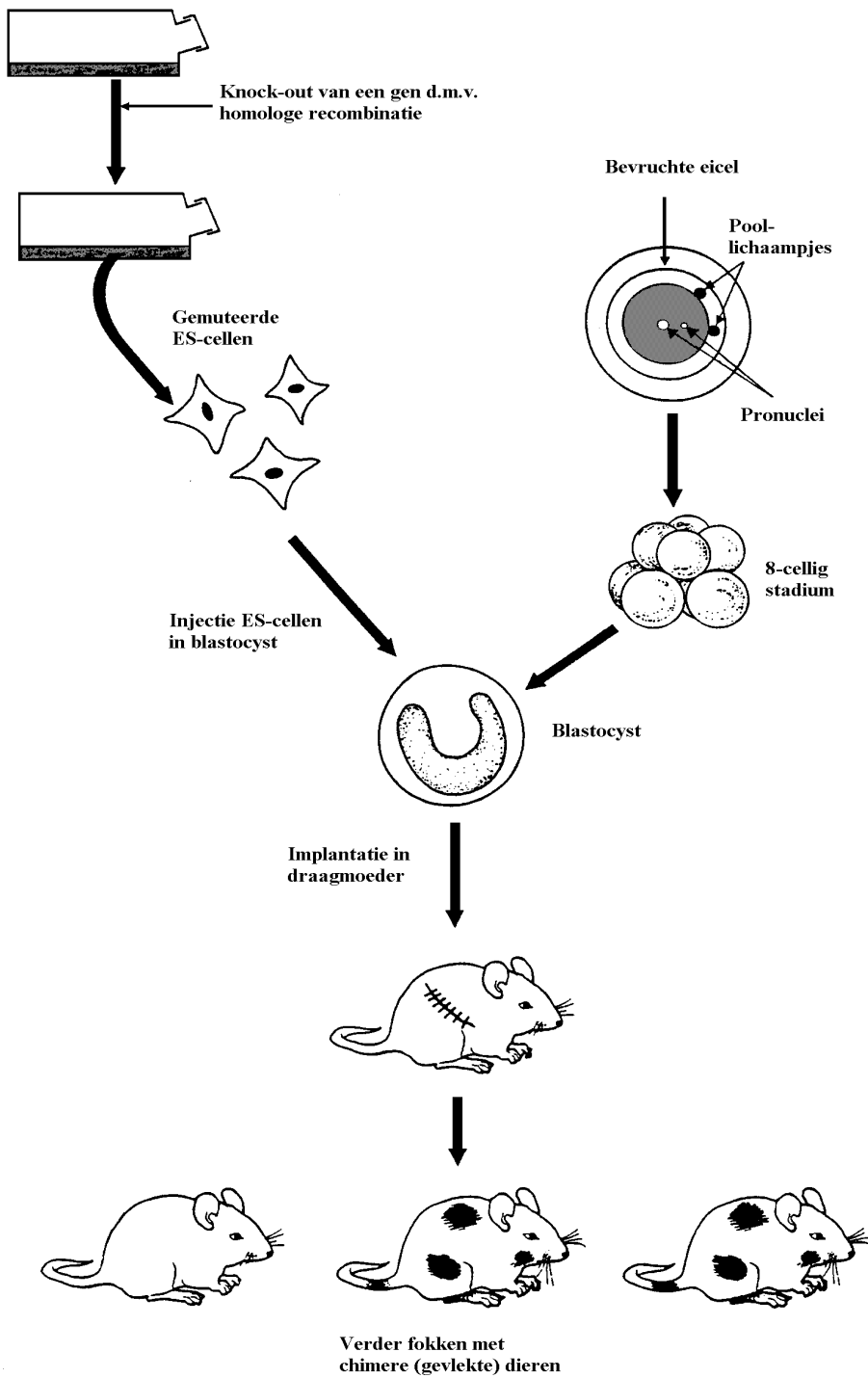
1. Aan een kweek van ES-cellen wordt een genconstruct toegevoegd. Dit genconstruct bestaat voor een deel uit DNA dat overeenkomt met een specifieke plaats op het muizen DNA (de 'target').

Figuur 1: Het maken van transgene muizen door middel van micro-injectie van DNA in een bevruchte eicel (uit: Van 't Hoog, 1998).





Figuur 2: Het maken van knock-out muizen via de embryonale stamcel techniek (uit: Van 't Hoog, 1998).



1

2

3

2. Deze overeenkomst zorgt voor herkenning, zodat het genconstruct op de gewenste plaats wordt ingebouwd. Bij ongeveer 1 van de 10.000 cellen wordt het construct ingebouwd. Bij een (klein) deel hiervan zit het transgen ook daadwerkelijk op de gewenste plaats. Door aan het transgen een markereigenschap te koppelen kan er reeds in de celkweek een selectie plaatsvinden op de ES-cellen, die het transgen op de gewenste plaats hebben.
3. Deze cellen worden verder gekweekt en uiteindelijk wordt een aantal ES-cellen in blastocysten (= zeer jong stadium van een embryo) geïnjecteerd. Voor het verkrijgen van deze blastocysten zijn 15 vrouwelijke muizen met superovulerende hormonen behandeld. Deze zijn bevrucht door 15 mannelijke muizen. In totaal leveren deze muizen 20 tot 80 blastocysten, waarin de knock-out ES-cellen worden geïnjecteerd. Tegelijkertijd worden 3-5 andere vrouwelijke muizen samengebracht met evenveel gesteriliseerde mannetjes (= gevasectomeerde dekmannen). Als deze muizen paren worden de vrouwtjes schijnzwanger en kunnen ze als draagmoeder (= foster) worden gebruikt voor de knock-out blastocysten. Per draagmoeder worden 12 tot 15 transgene blastocysten geïmplant.
4. Na 19-21 dagen worden de nakomelingen geboren. Een deel van de jonge dieren zal chimeer zijn. Dit zijn muizen waarvan een deel van de lichaamscellen de erfelijke eigenschappen van de knock-out ES-cellen heeft en een ander deel de erfelijke eigenschappen van de gebruikte blastocyst. Omdat de ES-cellen afkomstig zijn van een witte muis en de blastocyst van een zwarte, zullen de chimere dieren zwart-wit gevlekt zijn. Na selectie op de mate van chimeer zijn, worden de beste chimere dieren gekruist met muizen van de C57BL/6-stam. De nakomelingen hiervan kunnen een zwarte vacht of een beige (agouti) vacht hebben. De zwarte nakomelingen zijn 'normaal' (= wildtype). Van de agouti nakomelingen is volgens de Mendeliaanse verdeling de helft knock-out en de ander helft 'normaal'. De knock-out agouti's, ofwel de agouti-mutanten zijn de founders (= stamouders), waarmee na selectie wordt doorgefokt.

Dekmannen, gevasectomeerde mannen en fokdieren worden eenmaal per jaar afgevoerd. Per jaar worden er 63 dekmannen en 63 gevasectomeerde mannen ingezet. Het aantal fokdieren per jaar is afhankelijk van het aantal chimere dieren dat ingezet wordt voor de fok. De voorkeur gaat uit naar een mannelijk chimeer om mee te fokken, in dat geval worden er twee fokvrouwtjes per chimeer ingezet. Wordt er met een vrouwtjeschimeer gefokt, dan is de verhouding 1 op 1.

#### *Transgenen*

In laboratorium 2 zijn gegevens over het maken van founders verzameld. In de periode 1993 tot en met november 1999 is het gemiddelde percentage geslaagde transgenen over de gehele periode 10,2% (tabel 9). De jaren 1993 en 1999 zijn uitschieters als gevolg van respectievelijk startproblemen en personeelwisselingen, waardoor het percentage erg laag ligt (2,9% respectievelijk 3,6%). Als men deze uitschieters weglaat, dan komt het percentage op 13,7%. Over de gehele periode waren gemiddeld 74,4 dieren nodig om een transgene founder te maken, waarvan er 44,1 werden gedood (tabel 10). Als men de uitschieters 1993 en 1999 weglaat, dan krijgt men over 1995 tot en met 1998 een stabiel beeld te zien, waarbij gemiddeld 47,9 dieren nodig waren om een transgene founder te maken, waarvan gemiddeld 27,3 werden gedood.

#### *Chimeren en agouti-mutanten*

In de periode 1993 tot en met november 1999 is het gemiddelde percentage geslaagde chimere dieren (die niet ieder jaar werden gemaakt) over de gehele periode 50,5%. Chimere dieren zijn geen founders. Om founders te krijgen worden chimere dieren verder gekruist met C57Bl/6. Van de agouti's die hieruit geboren worden is 50% volgens de Mendeliaanse verdeling een mutant en daarom een founder. Het percentage geslaagde agouti-mutanten loopt sterk uiteen, van 25,6% in 1997 tot 0,9% in 1998. Tabel 10 geeft te zien dat er gemiddeld 12,6 dieren nodig zijn om een chimeer te maken, waarvan gemiddeld 6,8 worden gedood. In dit geval zijn er geen uitschieters. In het geval van agouti-mutanten, die in 1997 en 1998 zijn gemaakt, lopen de cijfers zeer sterk uiteen.

Het hoge aantal en percentage in 1993 werd veroorzaakt omdat men op dat moment nog onvoldoende ervaring met de techniek had (startfase). Het resultaat in 1999 wordt verklaard uit het feit dat er in dat jaar een personeelwisseling had plaatsgevonden en nieuwe mensen moesten worden opgeleid, uit de invloed van het genconstruct (in 1999 werden er voornamelijk founders voor het onderzoeksgebied geestesziekten gemaakt) en mogelijk door zoötechnische factoren, omgevingsfactoren of onbekende factoren. Aangetekend moet worden dat de gegevens over 1999 niet het hele jaar betroffen, omdat deze gegevens ten tijde van het onderzoek nog niet beschikbaar waren.

#### *Laboratorium 2: transgenen en knock-outs in 1998*

Hier volgt een overzicht van het percentage en aantal dieren zoals gebruikt in 1998 om een transgene of een knock-out founder te maken. Het jaar 1998 is representatief wat betreft het aantal dieren benodigd voor het maken van transgenen en knock-outs.

#### **Terminologie**

*Per transgeen/chimeer/agouti:*

*-Het aantal dieren nodig om 1 transgeen, chimeer of agouti-mutant te maken en het aantal dieren dat hiervan is gedood.*

*Per injectieronde:*

*-Het aantal dieren nodig voor 1 injectieronde en het aantal dieren dat hiervan is gedood.*

*Per jaar*

*-Het totaal aantal dieren dat er dat jaar is gebruikt en gedood, het aantal injectierondes en het aantal genconstructen. Let op: het totaal aantal agouti-mutanten gebruikt per jaar is inclusief de dieren gebruikt om een chimeer te maken.*

#### **Transgenen 1998:**

|                    |      |                        |
|--------------------|------|------------------------|
| Per injectieronde: | 10,7 | embryodonoren          |
|                    | 4    | fosters                |
|                    | 5,7  | pups niet transgeen    |
|                    | 1    | pup transgeen          |
|                    | 10,7 | dekmannen              |
|                    | 4    | gevasectomeerde mannen |
| TOTAAL             | 36,1 | waarvan 20,4 afgevoerd |

|               |      |                        |
|---------------|------|------------------------|
| Per transgeen | 10,7 | embryodonoren          |
|               | 4    | fosters                |
|               | 5,7  | pups niet transgeen    |
|               | 10,7 | dekmannen              |
|               | 4    | gevasectomeerde mannen |
| TOTAAL        | 35,1 | waarvan 20,4 afgevoerd |

**Percentage geslaagde transgenen ten opzichte van totaal aantal pups geboren: 15,4 %**

|                 |      |                         |
|-----------------|------|-------------------------|
| Totaal in 1998: | 61   | injectierondes          |
|                 | 16   | genconstructen          |
|                 | 241  | fosters                 |
|                 | 344  | pups niet transgeen     |
|                 | 63   | pups transgeen          |
|                 | 665  | embryodonoren           |
|                 | 63   | dekmannen               |
|                 | 63   | gevasectomeerde mannen  |
| TOTAAL          | 1439 | waarvan 1376 afgevoerd. |

***Knock-outs 1998: chimeren***

|                   |      |                        |
|-------------------|------|------------------------|
| Per injectieronde | 15   | blastocystdonoren      |
|                   | 2,3  | fosters                |
|                   | 2,9  | pups niet chimeer      |
|                   | 2,2  | pups chimeer           |
|                   | 15   | dekmannen              |
|                   | 2,3  | gevasectomeerde mannen |
| TOTAAL            | 39,7 | waarvan 20,2 afgevoerd |

|             |      |                        |
|-------------|------|------------------------|
| Per chimeer | 6,8  | blastocystdonoren      |
|             | 1    | fosters                |
|             | 1,3  | pups niet chimeer      |
|             | 6,8  | dekmannen              |
|             | 1    | gevasectomeerde mannen |
| TOTAAL      | 16,9 | waarvan 9,1 afgevoerd  |

**Percentage geslaagde chimeren ten opzichte van totaal aantal pups geboren: 43,2%**

|                 |     |                        |
|-----------------|-----|------------------------|
| Totaal in 1998: | 16  | injectierondes         |
|                 | 3   | genconstructen         |
|                 | 36  | fosters                |
|                 | 46  | pups niet chimeer      |
|                 | 35  | pups chimeer           |
|                 | 240 | blastocystdonoren      |
|                 | 63  | dekmannen              |
|                 | 63  | gevasectomeerde mannen |
| TOTAAL          | 483 | waarvan 448 afgevoerd. |

**Knock-outs 1998 - 1999: agouti's (aanname: 50% van de agouti's zijn mutant)**

|                   |       |                        |
|-------------------|-------|------------------------|
| Per agouti mutant | 5     | fosters                |
|                   | 6,5   | pups niet chimeer      |
|                   | 5     | chimeren               |
|                   | 1     | agouti's niet mutant   |
|                   | 34    | dekmannen              |
|                   | 34    | blastocystdonoren      |
|                   | 10    | fokdieren              |
|                   | 125,5 | pups niet agouti       |
|                   | 5     | gevasectomeerde mannen |
| TOTAAL            | 226   | waarvan 172 afgevoerd  |

**Percentage geslaagde agouti's mutanten ten opzichte van totaal aantal pups geboren na chimeerkruising: 0,9%**

|                      |     |                                  |
|----------------------|-----|----------------------------------|
| TOTAAL in 1998-1999: | 16  | injectierondes                   |
|                      | 3   | genconstructen                   |
|                      | 36  | fosters                          |
|                      | 46  | pups niet chimeer                |
|                      | 35  | pups chimeer (16 in fok=45,7%)   |
|                      | 240 | blastocystdonoren                |
|                      | 63  | dekmannen                        |
|                      | 63  | gevasectomeerde mannen           |
|                      | 3,5 | agouti mutant                    |
|                      | 3,5 | agouti niet mutant               |
|                      | 30  | fokdieren                        |
|                      | 401 | pups niet agouti                 |
| TOTAAL               | 921 | dieren, waarvan 726,5 afgevoerd. |

|      | % Transgeen | % Chimeer | % Agouti Mutant |
|------|-------------|-----------|-----------------|
| 1993 | 2,9         |           |                 |
| 1994 |             | 41,9      |                 |
| 1995 | 12,7        |           |                 |
| 1996 | 15,3        |           |                 |
| 1997 | 11,5        | 75,3      | 25,6            |
| 1998 | 15,4        | 43,2      | 0,9             |
| 1999 | 3,6         | 41,4      |                 |

Tabel 9: percentage transgeen/chimeer/agouti-mutant per totaal aantal pups geboren

|      | Per transgeen | Per chimeer | Per agouti mutant |
|------|---------------|-------------|-------------------|
| 1993 | 117,9/74,6    |             |                   |
| 1994 |               | 12,8/7,1    |                   |
| 1995 | 58,9/33,1     |             |                   |
| 1996 | 55,4/30,4     |             |                   |
| 1997 | 42,2/25,2     | 8,5/4,4     | 5,5/3,3           |
| 1998 | 35,1/20,4     | 16,9/9,1    | 226/172           |
| 1999 | 136,7/80,9    | 12,1/6,7    |                   |

Tabel 10: totaal aantal dieren benodigd/waarvan gedood per transgeen, chimeer of agoutimutant.

#### *De foundersselectie*

Nadat er enkele founders zijn verkregen, volgt er een selectie aan de hand van een aantal criteria. Met de geselecteerde founders wordt vervolgens een fok ingezet. De selectie vindt plaats op grond van de expressie van het genconstruct, het welzijn/fitness van de founder en de reproductiecapaciteit.

## BIJLAGE 4 DE FOK EN ZORGGEDRAG

### *Fok*

Met de geselecteerde founders wordt een fok ingezet. In de foklijsten worden gegevens over de fok genoteerd. De foklijsten geven gegevens over:

- datum
- ouders
- nestgrootte bij de geboorte
- nestgrootte bij het spenen
- man-vrouw verhouding van de jongen tijdens het spenen
- selectie na het spenen
- sterfte
- ziekte
- lichamelijke afwijkingen
- uiterlijk
- speciale behandeling

In de fokbak worden een tot vier vrouwtjes bij een tot meerdere mannetjes gezet. Fokbakken worden een maal per week overgezet, dat wil zeggen de ouders met hun jongen worden in een nieuwe bak met schone bedding geplaatst. Bij normale groei worden de jongen na drie weken gespeend en geselecteerd op sekse.

### *Zorggedrag*

Ouderdieren vertonen zorggedrag door het bij elkaar brengen en houden van de jongen in clusters. Dit gedrag werd in deze studie gedefinieerd als goed zorggedrag, omdat dit gedrag onder normale conditie vertoond wordt (Baroncelli, 1995; Brown, 1996; Li, 1999; Poole, 1987). Verstoting, verwaarlozing, her en der verspreide jongen en dode jongen werd in deze studie gedefinieerd als slecht zorggedrag (Baroncelli, 1995; Brown, 1996; Li, 1999; Poole, 1987). Sterfte bij de jongen kan veroorzaakt zijn door de onervarenheid van de jonge moeder die nog niet eerder een nest heeft gehad, kannibalisme, verdrukking of competitie door oudere jongen van een eerder nest, ziekte, of als gevolg van effecten veroorzaakt door het genconstruct in het ouderdier, wat leidt tot afwijkend zorggedrag, of effecten van het genconstruct in de jongen op de gezondheid of het gedrag van deze dieren.

Het zorggedrag wordt niet routinematig geobserveerd en genoteerd, daarom zijn de observaties speciaal voor dit onderzoek uitgevoerd in laboratorium 2 en laboratorium 3.

### Laboratorium 2

De gedragsobservaties vonden plaats over een periode van vijf maanden en betroffen 272 fokbakken waarin zich een mannetje, een of meerdere vrouwtjes en een of meerdere nesten bevonden. In 133 bakken werden knock-out muizen gefokt, in 110 bakken werden transgene muizen gefokt en in 29 bakken betrof het een kruising van een transgene en een knock-out lijn. Een keer per week, wanneer de ouders met de jongen werden overgezet in een schone bak, werd het zorggedrag geobserveerd na het overzetten. De muizen kregen een uur om te wennen aan de nieuwe omgeving en werden vervolgens geobserveerd. Fokbakken met jongen ouder dan ongeveer twee weken werden niet in de observaties betrokken, omdat de jongen al te oud en te zelfstandig waren om nog door hun ouders gehanteerd te worden. Bovendien waren aangetroffen dode jongen in bijna alle gevallen jonger dan twee weken.

Het zorggedrag werd vervolgens gerelateerd aan nestgrootte per fokbak, methode, achtergrondstam en type onderzoek.

### Nestgrootte per fokbak

Het mogelijke effect van nestgrootte op het zorggedrag van de genetisch gemodificeerde ouders werd bestudeerd omdat te grote nesten of teveel nesten in een bak tot een stressreactie bij de ouders kunnen leiden.

De waarnemingen vonden plaats per fokbak als eenheid, daarom werd nestgrootte gedefinieerd als het totaal aantal jongen per bak. Uit de resultaten bleek er geen significante relatie te bestaan tussen de nestgrootte en het zorggedrag van de genetisch gemodificeerde ouders. Hierbij dient aangetekend te worden dat in bakken met meerdere ouders het mogelijk negatieve effect van een groot aantal jongen op het zorggedrag van de ouders wordt gecompenseerd door de aanwezigheid van meerdere ouders per bak, die allen een deel van het zorggedrag op zich nemen.

### Methode van genetische modificatie

De resultaten gaven geen significant verschil tussen de drie toegepaste methodes van transgenese in relatie tot het zorggedrag.

### Achtergrondstam

Er werd een significant verschil ( $P < 0,005$ ) gevonden tussen genetisch gemodificeerde stammen met (een kruising van) C57Bl/6 achtergrond en zonder (een kruising van) C57Bl/6 achtergrond in hun zorggedrag. Muizen met (een kruising van) C57Bl/6 achtergrondstam vertoonden beter zorggedrag dan muizen zonder (een kruising van) C57Bl/6 achtergrondstam.

### Type expressie

In verschillende onderzoeksgebieden worden verschillende genconstructen gebruikt. Daarom zijn voor dit onderzoek de genconstructen gegroepeerd in vijf onderzoeksgebieden. De resultaten gaven een significant verschil ( $P < 0,005$ ) te zien tussen de onderzoeksgebieden. De fokken van het onderzoeksgebied Immunologie vertoonden beter zorggedrag dan de andere vier onderzoeksgebieden. Het onderzoeksgebied Geestesziekten, daarentegen, gaf het tegengestelde resultaat, de fokken vertoonden slechter zorggedrag dan de andere onderzoeksgebieden. Dit kan liggen aan de aard en de invloed van de gebruikte genconstructen. De genconstructen die worden gebruikt in het onderzoeksgebied Geestesziekten beïnvloeden het gedrag van de muizen. In de andere onderzoeksgebieden oefenen de gebruikte genconstructen invloed uit op de fysiologie van de dieren.

### Laboratorium 3

In laboratorium 3 is het zorggedrag ten behoeve van dit onderzoek geobserveerd door een dierverzorger. In totaal zijn 118 nesten geobserveerd in een periode van 6 maanden. Van de 118 geobserveerde nesten was er in vijf nesten sprake van kannibalisme. Bij de overige nesten is geen afwijkend zorggedrag geobserveerd. Het betrof twee lijnen gebruikt voor kankeronderzoek en drie lijnen die gebruikt worden voor onderzoek naar hart- en vaatziekten.



## BIJLAGE 5 NEVENPATHOLOGIE

Een ingebracht genconstruct heeft effect op het fenotype van het dier. In veel gevallen zijn deze effecten verwacht en verklaarbaar, bijvoorbeeld daar waar men een ziektemodel wil ontwikkelen om de oorzaken en symptomen van de betreffende ziekte te bestuderen. Niet alle effecten zijn verwacht en verklaarbaar, omdat de insertieplaats van het genconstruct vaak willekeurig in het genoom plaatsvindt en op deze wijze de werking van een actief gen kan verstoren, of omdat het genconstruct op een nog onbekende manier ingrijpt in de fysiologie van het dier. Deze onverwachte en onbedoelde effecten zijn in deze studie gedefinieerd als nevenpathologie. De informatie over nevenpathologie is verkregen uit de foklijsten, uit interviews met pathologen, een microbiologisch analist en onderzoekers en uit pathologische rapporten.

### *Laboratorium 2*

Er zijn interviews gehouden met onderzoekers van vier onderzoeksgebieden, te weten Immunologie (IM), Geestesziekten (GZ), Fysiologie en Metabole Ziekten (FM) en Kankeronderzoek (K), die in het totaal gebruik maakten van 64 genconstructen. De onderzoekers werd gevraagd of er bij hun fokken een afwijking op de Mendeliaanse verdeling werd gevonden (dat wil zeggen de verhouding homozygote, heterozygote en wildtype dieren per nest) en of er sprake was van nevenpathologie. Van 73% van de genconstructen was geen nevenpathologie bekend, 17,2% van de genconstructen was homozygoot letaal (dit geeft een afwijkende Mendeliaanse verdeling, omdat er geen homozygote jongen worden geboren) en in 9,8% van de gevallen was er sprake van diverse nevenpathologie of nevenverschijnselen, te weten: agressie (4x), eenmalige fokdepressie of structurele slechte fok (3x), prolaps (1x), slecht zogende moeders, met slechte en slecht groeiende nesten (1x), significant kleine nestgrootte (1x) en nierafwijkingen (1x). Agressie werd in drie van de vier gevallen aangetroffen bij het onderzoeksgebied Geestesziekten. Hier kon men geen verklaring voor geven.

| Genconstruct/<br>Nevenpathologie                   | KO<br>(21 genconstructen) | TG<br>(30 genconstructen) | TG x KO<br>(13 genconstructen) |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Geen nevenpathologie                               | 66,7%                     | 60%                       | 92,3%                          |
| Homozygoot letaal                                  | 23,8%                     | 20%                       | 7,7%                           |
| Diverse<br>nevenpathologie/<br>nevenverschijnselen | 9,5%                      | 20%                       | 0%                             |

Tabel 11: het percentage genconstructen waarbij nevenpathologie optreedt, op het totaal aantal genconstructen van hetzelfde type: knock-out (KO), transgeen (TG) of transgeen x knock-out (TG x KO).

| Onderzoeksgebied/<br>Nevenpathologie               | IM<br>(40 genconstructen) | GZ<br>(5 genconstructen) | FM<br>(18 genconstructen) | K<br>(1 genconstruct) |
|--|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Geen<br>nevenpathologie                            | 70%                       | 20%                      | 83,3%                     | 0%                    |
| Homozygoot letaal                                  | 25%                       | 0%                       | 11,1%                     | 0%                    |
| Diverse<br>nevenpathologie/<br>Nevenverschijnselen | 5%                        | 80%                      | 5,6%                      | 100%                  |

Tabel 12: Het type en percentage nevenpathologie en nevenverschijnselen per onderzoeksgebied.  
IM=immunologie, GZ=geestesziekten, FM=fysiologie en metabole processen, K=kankeronderzoek

### *Laboratoria 1 en 3*

In de laboratoria 1 en 3 onderwierpen twee onderzoeksgebieden de muizen aan een uitgebreid pathologisch onderzoek. In totaal zijn 16 transgene en knock-out lijnen en dubbelkruisingen bestudeerd. Vijf lijnen vertoonden onverwachte pathologie. De pathologie van twee van de vijf lijnen bleek achteraf beschouwd gerelateerd aan het genconstruct en verklaarbaar. De pathologieën veroorzaakten ernstig ongerief bij de dieren, die daarom werden afgemaakt. De overige drie pathologieën waren niet verklaarbaar. Eén pathologie veroorzaakte geen ongerief bij de dieren, één veroorzaakte matig tot ernstig ongerief. De derde pathologie kwam bij jonge dieren niet voor maar was alleen te zien bij dieren die ouder werden dan anderhalf jaar.

## LITERATUUR

- Baroncelli, S., Karrer, D., Turillazzi P.G. (1995). Oral Bis (TRI-n-Butyltin) Oxide in pregnant mice. 1. Potential influence of maternal behavior on postnatal mortality, *J. Tox-Environ. Health*, Nov., 46(3):355-67.
- Brown, J.R., Ye, H., Bronson, R.T., Dikkes, P., Greenberg, M.E. (1996). *Cell*, Vol 86, 297-309, July 26.
- Cardiff, R.D., M.R. Anver, B.A. Gusterson, L. Hennighausen, R.A. Jensen, M.J. Merino, S. Rehm, J. Russo, F.A. Tavassoli, L.M. Wakefield, J.M. Ward, J.E. Green (2000). The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 19, 968-988.
- Delpire, V. (1999). A proposal for a new ethical scheme addressing the use of laboratory animals for biomedical purposes. *ATLA* 27, 869-881.
- Hazekamp, A.A.H. & Tj. de Cock Buning (1998). *Health and Welfare of Transgenic Farm Animals. Past, Present and Perspectives*. Afdeling Dierproefvraagstukken, Universiteit Leiden.
- Hazekamp, A.A.H. & Tj. de Cock Buning (2000). Adverse effects of transgenesis in farm animals. In: Balls, M., A.-M. van Zeller & M.E. Halder (eds.). *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation*. Elsevier Science B.V.
- Hoog, A. van 't (1998). *Transgene dieren: Technieken en Trends*. Afdeling Dierproefvraagstukken, Universiteit Leiden.
- Inspectie V&W (1999). *Code of Practice. Dierproeven in het Kankeronderzoek*, Zutphen/Den Haag.
- Jackson Laboratory, the (1999). *Mouse Genome Informatics*. [Http://www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)
- Li, L.-L., Keverne, E.B., Aparicio, S.A., Ishino, F., Barton, S.C., Surani, M.A. (1999). *Science*, April 9, 284 (5412): 330-333.
- Meer, M. van der (1994). *Transgenese bij dieren*, University of Utrecht, Department. of Laboratory Animal Science, Utrecht, The Netherlands.
- Poole, T. (ed.) (1987). *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*, sixth edition, 1987, Longman Group Limited UK.
- Rowan, A.N. (1997). The concepts of animal welfare and animal suffering, In: Zutphen, L.F.M. van, Balls, M., (eds.), *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*, Elsevier Science B.V.
- Schmittekert, E.M., Prokop, C.M., Hedrich, H.J. (1999). DNA detection in hair of transgenic mice – a simple technique minimizing the distress on the animals, *Laboratory Animals*, 33, p. 385-389.

## **BEGELEIDINGSCOMMISSIE**

Prof. dr. H.A. de Boer  
Prof. dr. M. Korthals

Afdeling Medische Biotechnologie, Universiteit Leiden  
Afdeling Toegepaste Filosofie, Universiteit Wageningen en  
Lid Stuurgroep TA-projecten van het Ministerie van LNV  
Directie VVM, Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en  
Visserij

Drs. S. Knijff

Drs. J. Kuil/Drs. M. Raaijmakers  
Drs. M. van der Meer  
De directeur van laboratorium 2  
De manager van de laboratoria 1 en 3  
Prof. dr. L.F.M. van Zutphen

Nederlandse Vereniging tot Bescherming van Dieren  
Afdeling Proefdierkunde, Universiteit Utrecht

Afdeling Proefdierkunde, Universiteit Utrecht

## LNV-PROGRAMMA TECHNOLOGY ASSESSMENT (TA)

Sinds 1993 heeft het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij een Technology Assessment (TA)-programma. Dit programma is ondergebracht bij de directie Wetenschap en Kennisoverdracht (DWK) van het ministerie. Het programma heeft tot doel maatschappelijke vraagstukken te verhelderen, die samenhangen met wetenschappelijke en technologische ontwikkelingen die van belang zijn voor het beleidsterrein van het ministerie.

Het programma heeft tot doel bij te dragen aan de beleidsontwikkeling van het ministerie van LNV door:

- Verkenning van gevolgen van technologische ontwikkelingen en afweging van alternatieven en/of;
- Het verkennen van mogelijke technologische bijdragen aan de oplossing van maatschappelijke problemen en/of,
- Het onderkennen en expliciteren van normen en waarden die in het geding kunnen zijn bij bepaalde ontwikkelingen, alsook verschillen daarin tussen verschillende groeperingen in de samenleving.

Voor de *ontwikkeling van het programma* is een onafhankelijke Stuurgroep ingesteld. De Stuurgroep besluit ook over de *honorering van projecten* en over *publicatie van projectresultaten* in de publicatiereeks van het programma.

De LNV-Stuurgroep Technology Assessment kent de volgende samenstelling:

- drs. W.J. van der Weijden, voorzitter (Centrum voor Landbouw en Milieu)
- mw. prof. dr. J. Bunders (Vrije Universiteit, Amsterdam)
- dr. H. de Jager (Katholieke Universiteit Nijmegen)
- dhr. A. Kamp (veehouder)
- prof. dr. M. Korthals (Wageningen Universiteit)
- mw. Dr. ir. L. Sterrenberg (Rathenau Instituut)
- dhr. P. Blom (Triodos Bank)
- prof. dr. ir. J.L.A. Jansen
- mw. dr.ir. C.W. Rougoor (uitvoerend secretaris)

## LIJST VAN PUBLICATIES IN DE TA-REEKS

*Verlag over het jaar 1999.* Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 2000.

*Verkenning voedselveiligheid. Een inventarisatie van veranderingen in voedselketens en de potentiële gevolgen voor voedselveiligheid.* Freek de Meere et al. (LEI-DLO en RIKILT-DLO). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1999.

*Verlag over het jaar 1998.* Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1999.

*Functional Foods: van dilemma's naar beleid.* Dr. H. van den Belt et al. (Wageningen Universiteit, leerstoelgroep Toegepaste filosofie en leerstoelgroep Communicatie- en Innovatiestudies). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1999.

*Transgene Herbicide-resistente gewassen.* W.J. Bijman en L.A.P. Lotz (LEI-DLO en AB-DLO) Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1996.

*Productgegevens panklaar? Product Data Interchange in de biefstukketen.* I.A.M.A. Jahae (LEI-DLO). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1996.

*Moderne technieken tegen beregeur bij varkensvlees: Castratie, immunocastratie en beregeurdetectie.* J. van Casteren (ID-DLO). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1995.

*Volautomatische melksystemen.* P.B. de Boer, J.H.M. Metz en F.L. de Pater-Huijsen (IMAG-DLO, ID-DLO en STB-TNO). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1994.

*Invasieve voortplantingstechnieken bij landbouwhuisdieren: Doen of laten?* L.J.E. Rutgers en H.M. Sarink (RUU en ID-DLO). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1994.

*Agrarische ketens en biotechnologie.* W.J. Bijman, Chr.M. Enzing, A.J. Reinhard (LEI-DLO en STB-TNO). Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1994.

*Verlag over het jaar 1993.* Den Haag: Programma Technologisch Aspectenonderzoek. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. 1994.