

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO**AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven op Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

E-mail:

telefoon:

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN**1. Onderzoeksplan**1.1. **titel:** Ontwikkeling van diabetische nefropathie in hoogvet gevoerde APOE*3Leiden.CETP muizen1.2. **studienummer:** -1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** nvt**2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):**

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr:

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): biotechnisch analisten (art 12), en/of art. 9 medewerkers**Externe samenwerking (indien van toepassing):** nvt**3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:** zsm

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail)

Geplande duur van het onderzoeksplan: 4 maanden**Locatie waar dieren worden gehouden:****4. Codenummers volgens VWA-registratie:**

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Groep 1 tm 3	2	01	1	27	31	1	1	1	01	1	1	2	1
Groep 4 en 5	2	01	1	18	31	1	1	1	01	4	4	3	1
Groep 6	1	01	1	8	31	1	1	1	01	4	4	3	1
Oefenmuizen	2	01	1	6	29	1	1	1	01	4	1	1	1
Oefenmuizen	2	01	1	2	29	1	1	1	01	4	4	3	1

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

Kunnen wij door extra risicofactoren van het metabool syndroom toe te voegen aan het bestaande diermodel, een translationeel diermodel ontwikkelen voor diabetische nephropathie

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier

Vermoedelijk als gevolg van veranderingen in leefgewoonten treedt er de laatste jaren een sterke toename op van de incidentie van overgewicht, metabool syndroom en type-2 diabetes. Hierbij nemen ook de complicaties, zoals diabetische nefropathie, diabetische retinopathie, verslechterde wondgenezing en hart en vaatziekten bij diabetes type 2 toe. Gepaard aan de toename van deze diabetische complicaties neemt ook de vraag naar medicijnen om de complicaties te bestrijden toe. Hiervoor zijn geschikte diermodellen nodig, die goed gekarakteriseerd zijn.

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

6.b Wetenschappelijk belang:

Bij TNO hebben we recent steeds meer aandacht gegeven aan het ontstaan van diabetische complicaties. Een model voor spontane diabetische nefropathie (db/db muis) is gevalideerd in DEC 2822. Echter dit model is met name diabetisch zonder invloed van plasma lipiden. In het hyperlipidemische model APOE*3Leiden.CETP muizen hebben wij ook diabetische nefropathie gevonden (DEC2720), dit was na een lange interventie van 27 weken op hoogvet dieet met cholesterol en fructose drinkwater. Helaas bleek dat ook in dit model de nephropathie niet verder ontwikkeld was dan een klasse 2b (klasse 4 is ergste klasse). Uit deze proef (die overigens opgezet was om het model voor metabool syndroom te karakteriseren met name op plasma parameters) bleek dus dat dieetaire interventie niet voldoende is om diabetische nephropathie te ontwikkelen. Omdat hypertensie een belangrijke karakteristiek is van het metabool syndroom en dit ook een risico factor is voor nierschade, stellen we voor om ook dit kenmerk van het metabool syndroom toe te voegen aan het model. Hierdoor zal het model naast karakteristieken obesitas, dyslipidemie, hyperglycemie ook hypertensie bevatten was de transleerbaarheid vergroot.

Hypertensie kan op verschillende manieren worden geïnduceerd, waarvan in deze studie 4 worden toegepast.

1. Systemische hypertensie door het toevoegen van zout in het drinkwater. Dit is niet een sterke *trigger*, geeft niet in alle gevallen hypertensie, maar is nog nooit onderzocht in combinatie met een hoog vet dieet en fructose.
2. Systemische hypertensie door het toevoegen van zout aan het dieet. Dit is in de literatuur omschreven in chow dieten en 1 maal in een hoog vet dieet, waar het hypertensie veroorzaakte. In E3L en in combinatie met fructose is het effect onbekend.
3. Locale hypertensie/filtratie in de nier door unilaterale nephrectomie, geeft matige nierschade, zonder toevoeging van DOCA behandeling, zie hieronder. Effect in combinatie met hoogvet dieet en fructose onbekend.
4. Systemische hypertensie door s.c. toediening van deoxycorticosterone acetate. Geeft sterke hypertensie in verschillende modellen. Sterke inducer, maar minder transleerbaar dan een zoutrijk dieet/water.

In de literatuur is beschreven dat fructose zout opname in de darm en zout retentie in de nier bevordert (M. Soleimanie Acta Physiol 2011:201:55-62). Ook geeft fructose een meer humaan lipiden profiel, daarom is besloten fructose water aan alle groepen toe te voegen.

Graag zouden wij willen bekijken of door toevoeging van een extra risicofactor, nl hypertensie, in dit model diabetische nephropatie ontstaat. Ook zouden wij willen onderzoeken en bestuderen hoe de ontstane nephropathie zich verhoudt tot wild-type dieren. Dit zal inzicht geven op het effect van risico factoren op het ontstaan van diabetische nephropatie. Het model zal dan ook beter gekarakteriseerd zijn en gevalideerd voor medicijn onderzoek.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld? Ja

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat? Het protocol is opgesteld en goedgekeurd in samenspraak tussen onze deskundigen van het [] en onderzoeker van [] in []

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):

- ☒ nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
wettelijke eis:
testrichtlijn:
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

week of treatment:	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. HFD + chol + fructose water	x				x												
2. HFD + chol + salt water/fructose water	x				x												
3. HFD + chol + salt in diet + fructose water	x				x												
4. HFD + chol + salt/fructose water + nephrectomy	x				x				x								
5. HFD + chol + DOCA + salt/fructose water + nephrectomy	x				x				x								
6. C57Bl/6: HFD + chol + DOCA + salt/fructose water + nephrectomy	x				x				x								
fructose water					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Body weight + food intake					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Plasma total cholesterol and triglycerides					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Plasma insulin and glucose					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Urine collection					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Blood pressure					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Sacrifice with blood & tissue collection					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

T=-4 weken

45 mannelijke APOE*3Leiden CETP muizen en 8 leeftijds gematchte wild type littermates dieren worden op een hoog vet dieet gezet met 1% cholesterol

T=0 weken

Muizen worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen via staartsnede om plasma lipiden en glucose en insuline te meten. Urine wordt verzameld dmv van direct opvangen na fixatie. De muizen worden gematcht in 6 groepen:

1)	Controle groep	E3L.CETP	HFD + 1% chol (+HFD) + fructose water	(n=9)
2)	Zout water groep	E3L.CETP	HFD + fructose/zout water	(n=9)
3)	Zout dieet groep	E3L.CETP	HFD + 8% zout + fructose water	(n=9)
4)	Nephrectomy groep	E3L.CETP	HFD +fructose/zout water + 1x nephrectomy	(n=9)
5)	Nephrectomy +DOCA groep	E3L.CETP	HFD +fructose/zout water + 1x nephrectomy+DOCA	(n=9)
6)	WT combi groep	C57Bl/6	HFD +fructose/zout water + 1x nephrectomy+DOCA	(n=8)

Zoutinterventie wordt gestart in de groepen 2-6. geen invasieve interventie wordt nog toegepast.

T=2 weken

Muizen worden gewogen.

T=4 weken

Muizen worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen. Urine wordt verzameld.

Interventie in groepen 4-6 wordt gestart:

Unilaterale nephrectomie wordt toegepast onder isofluraan anesthesie. Procedure is als volgt:

Pijnstilling door paracetamol 200mg/kg intra peritoneaal
Anesthesie met isofluraan
Muis wordt geplaatst op een warmte mat
Haren worden verwijderd en huid wordt schoongemaakt met jodium
Incisie van de huid (ca 1.5 cm) op de flank, waarna het peritoneum geopend wordt.
De nier wordt subtiel bewogen en het nierkapsel wordt verwijderd.
Het vasculaire bed wordt met een klem afgesloten
Met niet oplosbaar draad wordt het vasculaire bed afgebonden
De nier wordt verwijderd en de klem wordt verwijderd.
Groep 5-6: Een pellet met deoxycorticosterone ascetate wordt subcutaan aan de flank ingebracht
Het peritoneum en de huid worden apart van elkaar gehecht
De huid wordt wederom schoongemaakt met jodium
De muis wordt op een warmte mat in een schone bak gelegd tot deze hersteld is

De muizen worden hierna dagelijks gecheckt (huidwond, lichaamsgewicht en algehele conditie) tot ze hersteld zijn.

NB. Als pijnstilling wordt buprenorphine of ibuprofen afgeraden in het geval van nier falen omdat er een risico is op lethale accumulatie van buprenorphine en een verslechtering van nierfunctie bij gebruik van NSAIDs. Paracetamol wordt door [REDACTED] ([REDACTED] met veel dierexperimentele ervaring) op het [REDACTED] gebruikt. Hij heeft hier goede ervaringen mee.
Mogelijk extra paracetamol postoperatief, indien dit nodig wordt geacht.

T=6 weken

Muizen worden gewogen, en bloeddruk wordt gemeten met de cuff tail methode, non-invasief.

T=8 weken

Muizen worden gewogen, urine wordt verzameld en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen

T=11 weken

Bloeddruk wordt gemeten met de cuff tail methode, non-invasief.

T=12 weken

Muizen worden gewogen, urine wordt verzameld en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen. Alle dieren worden afgemaakt om diabetische nefropathie te bepalen.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING (diet)	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1 controle	HFD + 1.0% chol + 10% fructose water	Lichaamsgewicht (7x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), bloeddruk meten via cuff tail methode (2x), euthanasie via CO ₂	9	♂
2 Zout water	HFD + 1.0% chol + 10% fructose en zout	Lichaamsgewicht (7x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x),	9	♂

	water (1%NaCl+0.2% KCl water	bloeddruk meten via cuff tail methode (2x), euthanasie via CO ₂		
3 Zout dieet	HFD + 1.0% chol +8% NaCl + 10% fructose water	Lichaamsgewicht (7x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), bloeddruk meten via cuff tail methode (2x), euthanasie via CO ₂	9	♂
4 Unilaterale nephrectomie	HFD + 1.0% chol + 10% fructose water + unilaterale nephrectomie	Lichaamsgewicht (7x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), bloeddruk meten via cuff tail methode (2x),nephrectomy onder isofluraan, euthanasie via CO ₂	9	♂
5 Unilaterale nephrectomie + DOCA	HFD + 1.0% chol + 10% fructose en zout water (1%NaCl+0.2% KCl water + unilaterale nephrectomie +DOCA	Lichaamsgewicht (7x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), bloeddruk meten via cuff tail methode (2x), nephrectomy en plaatsing DOCA pellet onder isofluraan, euthanasie via CO ₂	9	♂
6 Wild-type Unilaterale nephrectomie + DOCA	HFD + 1.0% chol + 10% fructose en zout water (1%NaCl+0.2% KCl water + unilaterale nephrectomie +DOCA	Lichaamsgewicht (7x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), bloeddruk meten via cuff tail methode (2x), nephrectomy en plaatsing DOCA pellet onder isofluraan, euthanasie via CO ₂	8	♂
Oefen dieren	Oefenen nephrectomie	Onder isofluraan nephrectomie gevolgd door offeren. Niet bijkomen uit anesthesie.	6	
Oefen dieren	Oefenen nephrectomie	Onder isofluraan nephrectomie gevolgd door offeren. Bijkomen uit anesthesie.	2	

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard studieplan:

De groepsgrootte (6/groep) is gebaseerd op onze ervaring met de spreiding in de resultaten van voorgaande studie (DEC2720) is een powerberekening gedaan met een aan te tonen effect van 50% en een variatie van 25%. De alpha is 0.05 en power 0.9.

Uit experimenten uit het verleden is gebleken dat 15-20% van de APOE*3Leiden muizen laag responderen in cholesterol en triglyceride en ook 15-20% van de dieren (E3L.CETP en wild-type) minder obees en insuline resistent wordt op een hoog vet dieet (HFD). Dus additionele muizen worden aangevraagd.

Voor de groepen 1-5 zullen 3 additionele muizen worden aangevraagd (ivm low resp. obesitas/insuline resistentie en plasma lipiden) Voor de wild-type groep zullen 2 additionele muizen worden aangevraagd (ivm low-resp obesitas/insuline resistentie)

In totaal zullen 53 dieren aangevraagd worden.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

mannelijke APOE*3Leiden muizen worden gebruikt voor deze studie uit een voorgaande studie is gebleken dat deze muizen matige diabetische nefropathie ontwikkelen na 26 weken op een HFD+1.0% cholesterol+ fructose water. Deze muizen zijn uitermate geschikt om hyperlipidemie op te wekken. Wild type muizen worden gebruikt als controle voor een model met obesitas, insuline resistentie maar zonder hyperlipidemie.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☐ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☐ overcomplete dieren
- ☒ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- ☒ euthanasie ten behoeve van de proef (via CO2)
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Groepshuisvesting in macrolon bakken met kooiverrijking. Voer en water *ad lib*.

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief:

Geef hierbij, gespecificeerd **per handeling** of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(Be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
Groep 1-6	53	Lichaamsgewicht	7x	1
Groep 1-6	53	4h vasten	4x	1
Groep 1-6	53	Bloedafname via staart	4x	2
Groep 1-6	53	Urine verzamelen	4x	1
Groep 4-6	26	Nephrectomie onder isofluraan + bijkomen uit narcose	1x	3
Groep 5-6	17	plaatsing onder isofluraan (tijdens nephrectomie) en release DOCA	1x	1

Groep 1-6	53	Euthanasia via CO2/strekken	1x	1
Oefen muizen	8	Isofluraan + offeren	1x	1

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 4 Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandelings-effect.

Gebruik de codering:

Code 1: gering

Code 4: matig/ernstig

Code 2: gering/matig

Code 5: ernstig

Code 3: matig

Code 6: zeer ernstig

[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]

- 6 Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
Groep 1-3	27	2
Groep 4-6	26	3
Oefen muizen	8	1

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Bij afname staartbloed geen narcose omdat dit belastender geacht wordt dan bloedafname.

Bij nephrectomie wordt isofluraan anesthesie toegepast, tegelijkertijd wordt een DOCA pellet subcutaan geplaatst.

Postoperatieve pijnstilling wordt toegepast dmv paracetamol 300µL ip 15 min voor operatie. Dit wordt succesvol toegepast op [REDACTED] Buprenorphine of ibuprofen is af te raden in een model voor nierfalen er is dan een risico voor lethale accumulatie van buprenorphine en een verslechtering van nierfunctie met NSAIDs. Postoperatieve zorg is lichaamsgewicht checken en wond controleren.

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Bij meer dan 20% afvallen binnen 2 weken in de proef of binnen 2 dagen na de operatie worden deze muizen uit de proef gehaald. Ook bij andere tekenen van ziekte (pilo erectie, afscheiding rond de ogen) worden dieren voortijdig geëuthanaseerd.

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

Uit het voorgaande experiment is gebleken, dat geen bijkomende risico's zijn te verwachten voor dit ziekte model.

Van de zeer ervaren [REDACTED] ([REDACTED] met veel dierexperimentele ervaring, [REDACTED] [REDACTED]) hebben wij begrepen dat unilaterale nephrectomie weinig uitval van de dieren op zal leveren. Hij zal [REDACTED] en mogelijk [REDACTED] leren hoe deze operatie uit te voeren.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef? Geen
- Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:
- Gezien de complexiteit van de metabole processen die leiden tot diabetische nefropathie kan dit slechts onderzocht worden in intacte diermodellen en bestaan er geen alternatieve methoden om diabetische nieren te ontwikkelen.

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden: nvt

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [redacted]
 - ☐ Art. 14 functionaris ([redacted])
 - ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
 - ☐ elders, n.l.:
- X zo nee; waarom niet: Wij houden ons zelf continu op de hoogte van de ontwikkelingen op dit gebied.

ANDERE ASPEKTEN

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

Voor de opzet van de proef hadden wij ons laten leiden door de nephropathie die gevonden was in APOE*3Leiden.CETP muizen die voor 26 weken een hoogvet dieet met 1% cholesterol en 10% fructose in het drinkwater gekregen hadden (DEC2720). De nephropathie die in deze dieren gevonden was, werd als zeer ernstig (klasse 4) omschreven door de [redacted] van [redacted]. Daarom wilden wij in een opvolgende proef kijken hoe snel zich de nephropathie ontwikkelt door op verschillende tijdstippen muizen te offeren. Ook wilden we onderzoeken welke *triggers* cruciaal zijn in het ontstaan van de nephropathie (%vet in het dieet, % cholesterol in het dieet of het APOE*3Leiden.CETP gen). De proefopzet is door de DEC commissie goedgekeurd, waarna wij wilden beginnen met de proef (DEC3095).

Echter, helaas is de patholoog terug gekomen op zijn bevindingen en blijkt dat de nierschade die eerder als zeer ernstig (klasse 4) werd omschreven, nu slechts een klasse 2b was. Het ziekte model wat wij in handen dachten te hebben is er niet meer. Hierdoor moet onze proefopzet met spoed veranderen, om te voorkomen dat de muizen te oud worden.

In overleg met de mensen van de [redacted], hebben wij besloten de proef opzet te veranderen en de studie in totaal 16 weken te laten verlopen. Dit is korter dan de initieel aangevraagde studie (DEC3095), maar ligt in lijn met de laatste studies waarin naar nierschade gekeken is.

8 oefendieren zijn nodig om de nephrectomie te oefenen. Dit kunnen low-responder dieren zijn uit een andere proef (DEC3110 [redacted]), die momenteel loopt. De nephrectomie zal worden uitgevoerd door [redacted]. Zij leert dit van [redacted], die zeer bedreven hierin is.

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

HFD: High fat diet

E3L.CETP: APOE*3Leiden.Cholesteryl Ester Transfer Protein

[redacted]
Onderzoeker/projectleider

datum:

[redacted]
Research Manager

datum:

Na behandeling:
secretaris DEC

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker