

2011 - 12

Datum ontvangst DEC: 8 juli 2011

DEC nr: 3137

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient voor de uiterste inzendtermijn (zie Spider, cluster onderzoekers Art.9) volledig ingevuld **elektronisch** in het bezit te zijn van:

E-mail: [redacted]

Postadres:

[redacted]
[redacted]
[redacted]

telefoon: [redacted]

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** : Effects of dietary fat, cholesterol and angiotensin II receptor blockage on diabetic nephropathy in LDLR-/- mice

1.2.

1.3. **studienummer:**

1.4. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** 031.21234/01.01 3V's – werkzaamheid van geneesmiddelen

2. **Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):** [redacted]
[redacted]

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [redacted]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [redacted]
[redacted]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

3. **Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:** Zsm na goedkeuring DEC aanvraag
(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v.
DEC nr., via e-mail: [redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 30 weken

Locatie waar dieren worden gehouden: dierenlab

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-5	2	01	1	46	31	1	1	01	01	1	1	2	1
6, 8	2	01	1	14	31	1	1	01	01	4	4	3	1
7	2	01	1	8	31	1	1	01	01	4	4	1	1

RELEVANTIE

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

1. Treedt er progressieve nierschade op in LDLR-/- muizen na blootstelling aan hoog vet dieet? Diabetische nefropatie is de oorzaak van hoge morbiditeit en mortaliteit binnen de diabetische populatie. Om deze aandoening te kunnen onderzoeken is er grote behoefte aan een model waarin deze complicatie in combinatie met het ontwikkelen van metabool syndroom gebeurt. In DEC 2867 kon worden aangetoond dat blootstelling van LDLR-/- muizen aan high fat dieet (HFD) gedurende 20 weken tot duidelijke nierschade leidt. Op dit tijdstip wordt een maximale diabetische nefropatie score van 2b bereikt, terwijl zich in de mens een schade van klasse 4 ontwikkelt. Om te onderzoeken of nierschade zich verder ontwikkelt bij langere standtijd of dat de maximale nierschade score al bereikt is, zullen muizen langer (30 ipv 20 weken) vervolgd worden. Tegelijkertijd zal in deze groep muizen nauwkeurig worden onderzocht hoe zich andere parameters van metabool syndroom (insuline resistentie, plasma glucose & triglyceriden, etc) zich over deze lange periode ontwikkelen.

2. Wat zijn de effecten van cholesterol op de ontwikkeling van nierschade in LDLR-/- muizen. Naast een te korte belasting met HFD zou het ontbreken van systemische ontsteking een rol kunnen spelen in het niet verder ontwikkelen van nierschade. Om dit te onderzoeken zullen muizen na een run-in periode op alleen HFD, gevoerd worden met HFD + 2 verschillende concentraties cholesterol, waarvan bekend is dat dit een low level systemische ontsteking kan veroorzaken, die zou kunnen bijdragen aan het verder ontwikkelen van nierschade.

3. Wat zijn de effecten van angiotensin II receptor blockage op de ontwikkeling van nierschade in LDLR-/- muizen. In humane diabetische nefropatie speelt het renine angiotensine systeem (RAS) een grote rol in het ontstaan van pathologie. Hierbij wordt een belangrijke rol toebedeeld aan angiotensine II en één van de belangrijkste behandel methoden in de humane klinische situatie is dan ook het remmen van de effecten van angiotensine II. Om de rol van het RAS in het ontstaan van diabetische nefropatie te onderzoeken zullen de LDLR-/- muizen behandeld worden met Olmesartan, een angiotensine II receptor blokker.

4. Is het mogelijk om in de tijd de bloeddruk ontwikkeling te vervolgen middels implanteerbare bloeddrukmeters. Wat zijn de effecten van hoog vet dieet op bloeddruk in LDLR-/- muizen. Naast het optreden van obesitas, hyperglycemie en hypertriglyceridemie is een

verhoogde bloeddruk een belangrijke factor binnen het metabool syndroom. Tot nu toe is het erg moeilijk gebleken om bloeddruk in muizen in de tijd en na verschillende diëten te meten. In [REDACTED] is ervaring met het DSI systeem om bloeddruk in ratten te meten. Bij deze methode worden er dmv een operatie catheters die een bloeddruksensor bevatten in het bloedvat systeem van het dier geplaatst. Hierna is de bloeddruk continu te meten door de kooi op de meetopstelling te plaatsen. In deze pilot, zullen vier dieren geïmplantéerd worden die achtereenvolgens op chow, HFD en HFD + cholesterol dieet geplaatst zullen worden om de effecten van de diëten op bloeddruk te meten.

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

Obesity is one of the most important health threats facing the Western world. The increasing prevalence and severity of obesity have resulted in a higher prevalence of comorbidities including inflamed adipose tissue, insulin resistance, chronic inflammation, type 2 diabetes mellitus and its complications such as atherosclerosis or diabetic kidney disease.

So far there are no good models of metabolic disease in which the risk factors obesity, elevated triglycerides, chronic inflammation and insulin resistance are present. A major drawback of the current diet-induced obesity models is that animals do not show elevated plasma triglycerides or elevated free fatty levels upon high fat diet feeding and thus do not mimic the human situation. They often do also not show chronic adipose inflammation and vascular inflammation, which is a prerequisite for the development of atherosclerosis.

LDLR^{-/-} animals have predominantly been used as an atherosclerosis model and have not been tested in the setting of diet-induced obesity. Recent data (from literature and own experiments (for example DEC2867) suggest that the LDLR^{-/-} mouse model could be a good model for metabolic disorders since they display naturally high triglyceride levels and chronic inflammation and since these animals also develop atherosclerosis (Verschuren et al. Circ.Res., 2009). Furthermore, they develop kidney changes showing early kidney disease. It is assumed that this model is mimicking the human situation better than the standard diet-induced obesity models (i.e. C57BL/6 mice or ob/ob mice or db/db mice). A better and more translational model of insulin resistance/type 2 diabetes combining obesity, insulin resistance and atherosclerosis (in one mouse model) would facilitate research on metabolic disease and their complications.

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:

Overweight/obesity and its co-morbidities may in part be due to over-nutrition or an excess intake of saturated fat in the diet. As outlined above, there are currently no good models of diet-induced obesity and its complications (insulin resistance, atherosclerosis) that mimic the human situation sufficiently. Important limitations of the current models are the lack of elevated triglyceride levels and the lack of chronic inflammation and a pro-thrombotic state under conditions of high fat diet feeding. For example, high fat feeding in regular BL/6 mice or in ApoE3Leiden mice (also BL/6 background) results in a decrease in plasma triglycerides and does not cause vascular complications such as atherosclerosis. We recently showed that LDLR^{-/-} mice may constitute a good model for the metabolic syndrome since these mice develop obesity, insulin resistance and atherosclerosis in a sequential way (Verschuren et al., Circ Res, 2009) thereby mimicking the aetiology of human

disease. For example, animals have elevated plasma triglyceride levels due to the lack of the LDL receptor (no VLDL uptake from the circulation). Furthermore, studies under DEC 2867 suggests that under increasing concentrations of dietary fat as associated with increased occurrence of kidney changes suggesting that the model can develop diabetic nephropathy as a complication. In this study, we wish to investigate effects of prolonged exposure to dietary fat, cholesterol or angiotensin receptor blockage on the development of kidney disease.

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

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Zo nee, waarom niet?

Het studieplan is opgesteld in nauw overleg tussen ervaren wetenschappelijke medewerkers van TNO [REDACTED] binnen de propositie “3V-werkzaamheid van geneesmiddelen.”

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?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz.

Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

Diets:

- Chow (Ssniff® R/M-H) is the regular maintenance diet used at our facility and serves as control (main energy source is carbohydrate)
- 25% Lard (Research Diets) is the regular high fat diet used in settings of obesity.
- 25% Lard + 0,2% cholesterol
- 25% Lard + 1% cholesterol

Blood sampling

Blood samples will be collected in EDTA at the indicated time-points. 100 µl EDTA blood will be taken after tail cut and parameters of glucose metabolism (glucose, insulin, HbA1c) will be determined. Remaining plasma will be stored to enable detection of lipid parameters (plasma cholesterol, triglycerides, free fatty acids), adiposity parameters (adiponectin, leptin) and inflammation/prothrombotic state markers (fibrinogen, PAI-1, SAA, E-selectin) or ALAT (liver health marker).

Body weight and food intake will be monitored also bi-weekly during the experimental period and urine will be collected every 6 weeks (by simply lifting up the animal and letting them pee). Toelichting: In urine wordt albumine en creatinine gemeten omdat de albumine/creatinine ratio een merker is voor de conditie van de nieren.

sacrifice

Mice will be sacrificed using CO₂. Tissues to be collected: kidneys, adipose depots (for adipose composition; e.g. amount of visceral fat), serum, liver, and gut (and weighed where appropriate). Tissues will be stored at -80° C.

Osmotische pomp implantatie: pompjes (Alzet 1004, four week release) met Olmesartan (3 mg/kg/d) worden subcutaan geïmplantéerd op week 12 onder isofluraan anaesthesie

Implantatie catheter met bloeddruksensor: DSI PA-C10 blood pressure telemetry transmitters worden geplaatst volgens bijgevoegde handleiding. In het kort: muizen worden geschoren en huid wordt ontsmet. Onder is isofluraan anaesthesie wordt een 1,5 cm snede in de huid van de nek gemaakt, de carotis wordt vrijgeprepareerd en wordt het catheter ingebracht en tot in de aortaboog geschoven. Vastmaken met hechtingen. De transmitter wordt subcutaan ingebracht via dezelfde snede. Dichtmaken huid. Tijdens de operatie ligt de muis op een warmte matje. Op de huid wordt lidocaine gebracht als pijnstiller; voor de operatie krijgen de muizen een i.p. injectie met carprofen (de exacte doses en toedieningstijdstippen zullen in overleg met proefdierdeskundige worden vastgesteld).

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

Treedt er progressieve nierschade op in LDLR^{-/-} muizen na blootstelling aan hoog vet dieet?

Groep 1: 6 LDLR^{-/-} muizen: 30 weken 25% Lard dieet

Wat zijn de effecten van cholesterol op de ontwikkeling van nierschade in LDLR^{-/-} muizen.

Groep 2: 10 LDLR^{-/-} muizen: 16 weken chow

Groep 3: 10 LDLR^{-/-} muizen: 16 weken 25% Lard dieet

Groep 4: 10 LDLR^{-/-} muizen: weken 25% Lard dieet + 6 weken 25% Lard dieet + 0,2% cholesterol

Groep 5: 10 LDLR^{-/-} muizen: 10 weken 25% Lard dieet + 6 weken 25% Lard dieet + 1% cholesterol

Wat zijn de effecten van angiotensin II receptor blockage op de ontwikkeling van nierschade in LDLR^{-/-} muizen.

Groep 6: 10 LDLR^{-/-} muizen: 10 weken 25% Lard dieet + 6 weken 25% Lard dieet + 0,2% cholesterol; gedurende laatste 4 weken olmesartan via osmotische pomp. Vergelijk nierschade ontwikkeling met groep 4

4. Is het mogelijk om in de tijd de bloeddruk ontwikkeling te vervolgen middels implanteerbare bloeddrukmeters. Wat zijn de effecten van hoog vet dieet op bloeddruk in LDLR^{-/-} muizen.

Groep 7: max 8 dieren om implantatie te oefenen

Groep 8: 4 LDLR^{-/-} muizen: implantie, 1 week chow, 10 weken 25% Lard dieet + 6 weken 25% Lard dieet + 1% cholesterol

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	30 weeks HFD (25% lard)	- idem - bloedafnames na 4h vasten op t=0, en in week 2, 6, 10, 16, 22 en 30 - terminatie (met CO ₂)	6	M
2	Chow diet	- wegen (eens per 2 weken); - bloedafnames na 4h vasten op t=0, en in week 2, 4, 6, 8, 10, 12 en 16 - terminatie (met CO ₂)	10	M
3	16 weeks HFD (25% lard)	- idem	10	M
4	10 weeks HFD (25% lard) + 6 weeks HFD + 0,2% cholesterol	- idem	10	

5	10 weeks HFD (25% lard) + 6 weeks HFD + 1% cholesterol	- idem	10	M
6	10 weeks HFD (25% lard) + 6 weeks HFD + 0,2% cholesterol + Olmesartan	- idem - osmotic pump implantation - ip carprofen	10	M
7		Oefenen catheter implantation	Max 8	M
8	10 weeks HFD (25% lard) + 6 weeks HFD + 1% cholesterol	- idem - catheter implantation - ip carprofen	4	M

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:

Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

In de afgelopen jaren hebben we vergelijkbare experimenten in ApoE3Leiden muizen uitgevoerd (lipiden studies) en o.a. het effect van dieten en compounds op plasma lipiden en inflammatie onderzocht. Er is gekozen voor 10 muizen uitgaande van een gemiddelde variatie van 15% en een gewenst minimaal verschil van 45%, bij een tweezijdige toets met 95% zekerheidsinterval.

Voor de pilot in groep 8 zijn 4 muizen gekozen, dit is voldoende om de potentie van deze methode te kunnen onderzoeken.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

Mannelijke LDLR-/- muizen (leeftijd 12 weken bij start). De keuze voor mannetjes is gebaseerd op het feit dat mannetjes sterker in hun lichaamsgewicht toenemen op hoog vet dieet. Daardoor zijn effecten duidelijker zichtbaar te maken. Daarnaast zijn in voorgaand onderzoek omtrent insuline resistentie en type 2 diabetes ook mannetjes muizen gebruikt en weten we dat mannetjes nierschade ontwikkelen. Door nu weer mannetjes te gebruiken zijn de effecten in LDLR-/- muizen beter met andere studies in het verleden vergelijkbaar.

Voor het oefenen van implantatie van bloeddrukmeter zullen beschikbare muizen vanuit fokoverschot worden gebruikt (genetische achtergrond niet belangrijk, moeten wel van vergelijkbare leeftijd zijn).

13. Wat is de herkomst van de dieren:

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

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- ☐ x euthanasie ten behoeve van de proef
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, **n.l.:**

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Groepshuisvesting in type III macrolon bakken (lieft n=3 muizen/bak zoals gespecificeerd in van Loo *et al.*, Male management: coping with aggression in male laboratory mice, *Laboratory animals*, 2003, review).

Voer en water ad lib. Kooiverrijking, eventueel knaaghoutje (bij vechters).

Muizen uit groep 8 (bloeddrukmeting) worden per 2 geplaatst, zodat goede aflees van transmitter mogelijk is

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
1-6,8	60	4 uur vasten	7-8 maal	1
1-6,8	60	Wegen	1x per 2 weken	1
1-6,8	60	Bloedafnames	7-8 maal	3
1-6,8	60	Terminatie CO ₂	1 maal	1
6	10	Osmotische pomp	1x	3
7	8	Oefenen implantatie bloeddrukmeter (offeren onder narcose)	1x	1
8	4	Implantatie bloeddruk meter	1x	3

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 behandel-effect.
Gebruik de codering:
Code 1: gering
Code 2: gering/matig
Code 3: matig
Code 4: matig/ernstig
Code 5: ernstig
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
1-6,8	60	3
7	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.

Implantatie van osmotische pomp en bloeddruksensor vinden plaats onder isofluraan anesthesie. Er zal voor de operatie carprofen worden gespoten.

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

Er worden geen specifieke risico's voorzien. Bij het voordoen van problemen zoals extreem gewichtsverlies, lijden door bijv. bijtenden, of abnormaal gedrag (bolle rug, haren overeind, verminderde locomotie) zal de muis frequent geobserveerd worden en eventueel individueel

gehuisvest worden. Mocht de situatie niet spoedig verbeteren zal het dier voortijdig worden gedood.

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

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Dat is onwaarschijnlijk omdat we al eerder vergelijkbare dierexperimenten hebben uitgevoerd zonder dat er bijzonderheden waren opgetreden. Daarnaast zijn de mensen met artikel 9 en 12 goed getraind en hebben veel ervaring met het proefdierwerk.

Het implanteren van de bloeddruksensor is wel een ingewikkelde procedure. Om risico's op complicaties te voorkomen zal voor operatie contact gezocht worden met collega's op het [REDACTED] waar ervaring bestaat met dergelijke implantaties. Daarnaast zal het implanteren eerste worden geoefend onder narcose, waarna de correcte plaatsing van de sensor in de aortaboog zal worden gecontroleerd.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

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

Een belangrijke uitlees parameter is lichaamsgewicht en vetsamenstelling. Daarvoor is het gehele organisme nodig. Bij de reactie op een dieet zijn zeer veel verschillende weefsels en celtypen betrokken. Voor de studie van dergelijke complexe interacties zouden *in vitro* alternatieven tekortschieten. Er is gekozen voor het LDLR-/- muis model omdat deze dieren verhoogde triglyceriden en vrije vetzuren hebben (ook onder high fat feeding condities) en omdat deze dieren complicaties kunnen ontwikkelen (bijv atherosclerose). Dit is een heel belangrijk element, zeker voor de vertaalslag van de bevindingen naar de mens.

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.:

☒ elders, n.l.: journals, vaktijdschriften en discussies met andere onderzoekers hoe experimenten verbeterd of verfijnd kunnen worden (eigen 'drive' om dierproeven te verminderen en te verfijnen).

☒ zo nee; waarom niet, wij houden ons zelf 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?

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

Geen verdere aspecten.

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

LDLR low density lipoprotein receptor

Onderzoeker

Management

datum:

datum:

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