

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-054

Ontvangen: 06-04-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-04-2011	Nieuw

VROM/GCONR ³
DGM/SAS IG 06-110

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	30983280B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek

Het effect van overexpressie op atherosclerose formatie in ApoE knock-out muizen met en zonder STZ-geïnduceerde diabetes.

startdatum 1-9-2011

einddatum 9 17-8-2013

Duur van de proef¹⁰: 26 wk

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)			Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷			Art.9	
3. Projectleider				

Diergroep	1	2	3	4
ctrl/exp/sham	ApoE Niet diabeet	ApoE Niet diabeet	ApoE Diabeet	ApoE Diabeet
Diersoort	muis	muis	muis	muis
Stam	C57bl6	C57bl6	C57bl6	C57bl6
Construct / mutatie ?	ApoE	ApoE/Glo1	ApoE	ApoE/Glo1
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01
Aantal	20	20	20	20
Geslacht	m	m	m	m
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja
Leeftijd/gewicht	12wk	12wk	12wk	12wk
Doel van de proef *	31	31	31	31
Belang van de proef *	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01
Anesthesie *	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	01	01	01	01
Mate ongerief *	03	03	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Het effect van overexpressie op de ontwikkeling van atherosclerose in muizen.

1. Doel van de proef.

Hart- en vaat ziekten, met als onderliggende oorzaak atherosclerose komen bij diabetes vaker voor dan in de gezonde populatie en zijn bij deze patienten de voornaamste doodsoorzaak. Het ruptureren van de instabiele atherosclerotische plaque wordt als voornaamste oorzaak gezien voor het ontwikkelen van acute complicaties als hartinfarct en beroerte. Naast de structurele afwijkingen zijn ook de metabole eigenschappen van de plaque belangrijk.

aangetoond in homogenaten van instabiele plaques van de humane arteria carotis. De levels van welke zijn geassocieerd met plaque destabilisatie. Tevens tonen wij met immunohistochemie aan dat in plaques macrophagen en endotheel cellen positief aankleuren voor

De genoemde

In het lichaam worden

normaliter afgebroken door

hierbij het meest van belang. Wij vonden in instabiele plaques een verlaagde expressie mRNA en eiwit van

Onze hypothese is dus dat onder invloed van

Mogelijk dragen de vervolgens bij aan het ontwikkelen van een instabiel plaque phenotype. Omdat patienten met diabetes een verstoord glucose en lipiden metabolisme hebben is het aannemelijk dat dus een rol spelen bij de versnelde ontwikkeling van atherosclerose in patienten met diabetes, maar dit proces zou echter ook van belang kunnen zijn voor patienten met hart- en vaatziekten zonder diabetes.

Het project beoogt dan ook de vraagstelling te beantwoorden of betrokken zijn bij het ontwikkelen van atherosclerose en of een verhoogde activiteit van het deze ontwikkeling kan tegen gaan.

We willen deze hypothese testen door te onderzoeken of transgene overexpressie van de ontwikkeling van atherosclerose en een instabiel plaque phenotype tegengaat in de ApoE^{-/-} muis zonder en met streptozotocine (STZ) diabetes inductie.

Het onderzoek is ingebed in het onderzoeksinstituut CARIM, lijn III vasculaire biologie. In het onderzoeksproject wordt expertise ingebracht vanuit de Het uiteindelijke doel van dit onderzoek is enerzijds tot nieuwe biomarkers voor vaatlijden te komen en anderzijds nieuwe therapieën te ontwikkelen om middels manipulatie van het glyoxalase systeem of methylglyoxal productie tot nieuwe behandelingen van atherosclerose te komen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Hart en vaatziekten behoren niet alleen tot de meest voorkomende doodsoorzaken, atherosclerose veroorzaakt ook als chronische ziekte in de vorm van bijvoorbeeld hartfalen een zeer hoge ziektelast. Tevens is het zo dat de bekende bijdragende factoren als diabetes, veroudering en nierfalen sterk toenemen in de toekomst. Een betere behandeling, vroegtijdige diagnose en preventie van atherosclerose is dus nodig om de ziektelast van deze aandoeningen in de toekomst te beperken. Het is tevens zo dat het mechanisme waardoor atherosclerose

ontstaat grotendeels nog onbekend is en een groot gedeelte van het risico voor het ontwikkelen van hart en vaatziekten onverklaard blijft. Mechanistische studies naar factoren die aan atherosclerose bijdragen blijven dus noodzakelijk.

3. Alternatieven

Het ontstaan van atherosclerose en plaque instabiliteit en de invloed van diabetes hierop betreft een zeer complex mechanisme met een samenspel van onder andere endotheel, glad spierweefsel en andere celtypen (o.a. vetcellen en monocysten/macrofagen). Het complexe samenspel tussen de verschillende celtypen kan niet in vitro nagebootst worden. Verder is de mogelijkheid om de over-expressie van een bepaald gen te onderzoeken in vivo, met de huidige middelen, uitsluitend mogelijk in kleine proefdieren (rat/muis). Er zijn geen lagere diersoorten beschikbaar waarin zowel de ontwikkeling van atherosclerose als ook het effect van een transgene interventie bestudeerd kan worden. Voor dit type experimenten zijn dus proefdieren nodig.

4. Ethische afweging

Hoewel de behandeling van acute complicaties als hartinfarcten en beroertes de laatste jaren sterk is verbeterd, is de lijdensdruk voor mensen met hartfalen en verlammingen na een beroerte zeer groot. Door het toenemen van hart en vaatziekten in de toekomst en de verbeterde behandeling van acute complicaties zal deze groep met chronische beperkingen dus met name toenemen. Het is daarom van belang therapieën te ontwikkelen waarmee juist de plaque ontwikkeling en destabilisatie wordt tegengaan. Tevens is het hierbij belangrijk om biomarkers te ontwikkelen om beter in kaart te brengen welke patienten met een verhoogd risico meer gevaar lopen acute en daaruit volgende chronische complicaties te ontwikkelen. Dit potentiële voordeel weegt op tegen het ongerief dat de dieren gedurende deze proef ondervinden.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Atherosclerose is een zeer ingewikkeld ziekteproces waarbij lipiden accumulatie en inflammatie een centrale rol spelen (overzichtsartikel Libby P, Ridker P, Maseri A). Naast deze bekende mechanismen worden ook nieuwe factoren bestudeerd welke aan plaque progressie kunnen bijdragen. Dit zijn een voorbeeld van nieuwe factoren die aan plaque progressie bijdragen.

Deze complexe structuren worden vooral gevormd in een

Met name diabetische- en nierpatiënten zijn gevoelig voor het (Kilhovd BK 1999). Er is veelvuldig beschreven dat oorzaak zijn voor het ontstaan van vasculaire complicaties (Brownlee M 2001). Ook de is veelvuldig gelinkt met complicaties (Bourajjaj M 2003). wordt in ons lichaam gevormd als een bijproduct van de glycolyse en kan dan

Er bestaat in ons lichaam ook

Figuur 1. De vorming van

Figuur 2.

Eerder werk uit onze onderzoeksgroep liet zien dat overexpressie in ratten welke door middel van STZ diabetes ontwikkelen de verminderd is en de vasculaire reactiviteit verbeterd. Omdat wij in humane plaques een toename van en een afname van observeren willen wij ook onderzoeken of een overexpressie tot een verbetering van het atherosclerotische fenotype kan leiden, en met name de versnelde ontwikkeling van atherosclerose bij mensen met diabetes kan tegengaan.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het huidige voorstel is ontwikkeld in samenwerking en tot stand gekomen door intensieve samenspraak met verschillende groepen binnen CARIM en is beoordeeld en akkoord bevonden door

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor dit experiment zal de zowel de spontane als diabetes geïnduceerde ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd worden in C57BL6 ApoE $-/-$ knockout muizen, vergeleken met C57BL6 ApoE $-/-$ muizen met heterozygote $+/+$ overexpressie. Aan het einde van het experiment, worden de dieren als deze 25 weken oud zijn, opgeofferd middels CO_2/O_2 -vergassing en exsanguinatie voor histologische analyse van de aorta en andere inwendige organen.

7b. Sexe

Voor dit experiment zullen alleen mannetjes gebruikt worden. De biologische variatie in de ontwikkeling van atherosclerose in de muis is zeer groot. Biologische factoren die de variatie in de plaque verder doen toenemen, waarvan geslacht een duidelijk voorbeeld is, dienen vermeden te worden omdat de kans op een statistische type II fout hierdoor toeneemt.

7c. Aantallen

De grootte van de groepen wordt bepaald door de variatie in plaque oppervlak en eigenschappen tussen de verschillende groepen. Uit de literatuur weten wij dat de spreiding van plaque oppervlakte in de interventie en controle groep groot is (naar verwachting 30% bedraagt) en achten wij een minimaal verschil tussen beide groepen van 30% aannemelijk. De groepsgrootte is berekend met het "power and sample size"-programma, met een $\alpha=0,05$, $\text{power}=0,8$, $M=1$ (ratio n-controle/n-interventie), $\delta=$ en $\sigma=$ voor 'T-test with independent samples'. Hierdoor komt de groepsgrootte op $n=16$. Op grond van eerdere ervaring met STZ diabetes injecties wordt uitval op 20% geschat. Reden van uitval is met name het optreden van hypoglykemie na STZ inductie, om dit tegen te gaan worden de dieren nuchter gehouden voor de injecties, en zal er sucrose aan het drinkwater worden toegevoegd. Een andere reden voor uitval is dat een humaan eindpunt wordt bereikt omdat de dieren te veel gewicht ($>25\%$) verliezen door de katabole toestand waarmee diabetes gepaard gaat. Deze uitval zal tegen worden gegaan door de dieren te wegen, en als de gewichtafname te groot is ($>10\%$), het injecteren van een subcutaan insuline pellet. Bij deze uitval verwachten wij dat per groep 4 muizen extra nodig zijn. Dit brengt het totaal per groep op 20 muizen..

Het totaal aantal muizen wordt dan 80

Fase 1: Er wordt een fokprogramma opgezet om voldoende ApoE knockout muizen met en zonder heterozygote overexpressie te verkrijgen. De muizen zullen worden gegenotypeerd dmv PCR van een oorknip. Het moment waarop de muis geboren is stellen we als week nul in het experiment.

Spontane atherogenesis

- 1 ApoE knockout zonder overexpressie (n=20), geen diabetes
- 2 ApoE knockout met overexpressie(n=20), geen diabetes

- 3 ApoE knockout zonder overexpressie (n=20), STZ injectie week 9

Fase 3

Case 4:

25 weken na geboorte worden de dieren opgeofferd middels vergassing met een mix van CO₂ en O₂ voor post-mortem analyse van de aorta, nieren, lever en beenmerg. Hier wordt tevens bloed afgenomen middels intracardiale punctie om de analyses om grotere hoeveelheden bloed te verkrijgen voor het meten van biomarkers.

Flowchart is toegevoegd (bijlage 2)

9a. Anesthesie

Omdat de dieren geen operatieve interventie ondergaan is anesthesie niet van toepassing.

Omdat het niet te verwachten is dat de dieren pijn zullen ontwikkelen ten gevolge van diabetes of atherosclerose is pijnbestrijding niet van toepassing.

Na afloop van het experiment wordt het dier opgeofferd dmv vergassing met een CO₂/O₂ mix. De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- **Gegeneraliseerde afname in zelfverzorging en abnormale verschijning over een lange periode.** I.h.b. ruwe haarvacht, uitgebreide alopecia, verlengde diarree, gezwollen extremiteiten, paralyse of andere neurologische verschijnselen (convulsies, abnormale hoofddracht, circulerend gedrag). Specifiek voor diabetes is tevens gewichtsafname te verwachten. Als een gewichtsafname van meer dan 25% t.o.v. dag 0 tgv van inductie van diabetes geconstateerd wordt welke niet met insuline pellet gecorrigeerd kan worden (bij >10%afname is wordt een insuline pellet geplaatst) en het dier ongerief vertoond (eerder genoemde punten) zullen deze dieren geëuthaniseerd worden.

Zorg

10a. Ongerief



De ongerief score voor dit protocol is matig (03) in de niet-diabetes groepen en ernstig (05) in de diabetes groepen.

Controle groepen (1x ApoE -/- en 1x ApoE met verexpressie +/-)

Te verwachten mate van ongerief voor de dieren in de verschillende fases van het onderzoek:

Interventie	Duur	Frequentie	Aard ongerief	Mate ongerief
Bloedafname uit vena saphena magna	5 min	2 maal	Stress, pijn	gering/matig (02)
Verblijf in metabole box voor collectie urine	24 uur	2 maal	Stress	gering/matig (03)
Opofferen dieren (co2/02)	-	1 maal	Stress	gering/matig (02)

Totaal: gering/matig (02)

Diabetes groepen (1x ApoE -/- en 1x ApoE met GLO overexpressie +/-)

Te verwachten mate van ongerief voor de dieren in de verschillende fases van het onderzoek:

Interventie	Duur	Frequentie	Aard ongerief	Mate ongerief
Bloedafname uit vena saphena magna	5 min	2 maal	Stress, pijn	gering/matig (02)
Verblijf in metabole box voor collectie urine	24 uur	2 maal	Stress	gering/matig (03)
Vorbereiding proef: STZ injectie	Injectie: min Periode van mogelijke hypoglykemie variabel	1 maal	Stress, hypoglykemie	matig / ernstig (04)
Glucose controles na STZ injectie uit staartvene	5 min	3 maal	Stress, pijn	gering/matig (02)
<i>Diabeet worden/zijn (15 weken)</i>	15 weken	-	Stress, meer dorst, meer honger, meer urineren, gewichtsverlies	matig / ernstig (04)
Opofferen dieren (co2/02)	-	1 maal	Stress	gering/matig (02)

Totaal: matig / ernstig (04)

De dieren zullen het meeste ongerief ondervinden van de STZ injecties, met als gevolg hypoglykemieën en het vervolgens ontwikkelen en hebben van diabetes.

10b. Welzijnsevaluatie

De ApoE muizen ontwikkelen atherosclerotische plaques, maar zover bekend ondervinden de dieren hier weinig last van, plaque ruptuur komt niet bij deze proefdieren voor. Van de geïsoleerde huisvesting voor het opvangen van urine zullen de dieren tijdelijk ongerief ondervinden. Ook zullen de dieren stress en ongemak ondervinden van het de vena saphena magna punctie. De voornaamste bron van ongemak zal de inductie van diabetes zijn in 50% van de dieren. Het gaat hierbij met name om een toename van eten en drinken, alsmede urineren en gewichtsverlies. In dieren waarbij gewichtafname te groot is (>10%) worden insuline depots subcutaan geïnjecteerd. In de periode vlak na de STZ inductie hebben dieren juist met name hypoglykemieën.

gepaard gaand met verhoogde voedselinname en een sterke adrenerge respons. Om dit zo veel mogelijk tegen te gaan, zullen de dieren sucrose water te drinken krijgen, en vooraf aan de injecties nuchter gehouden worden, om de overmatige insuline release en daarmee hypoglykemieën bij het vernietigen van de beta cellen tegen te gaan. **Tevens zullen de dieren driemaal na STZ injectie op het ontwikkelen van diabetes gecontroleerd worden middels een staartprik.**

11. Verzorging en huisvesting

De muizen zullen onder normale omstandigheden worden gehuisvest in de ruimtes van het CPV.

12. Deskundigheid

Alle betrokken personen hebben de artikel 9 bevoegdheid.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De SOPs staan uitgebreid beschreven in de bijlagen:

Bijlage 1

SOP1: metabole kooi

SOP2: vena saphena magna punctie

SOP3: inductie STZ

SOP4: opofferen van de dieren

Bijlage 2:

Tijdspad

Relevante literatuur

-Libby P et al, circulation, 2002;105:1135-1143

-Kilhovd BK et al. Diabetes Care. 1999 Sep;22(9):1543-8.

-Brownlee M. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

Bijlage 1

SOP 1: metabole kooi

- Op tijdstip 12 weken en op 24 weken.
- Voor de collectie van urine en het meten van energie intake zullen de muizen 24 uur in de metabole kooi verblijven.

SOP 2: vena saphena magna bloedafname

- Dieren moeten overnacht nuchter zijn ivm cholesterol bepaling
- Op tijdstip 12 en 24 weken
- Door middel van een punctie in de vene saphena magna wordt 200ul bloed afgenomen.

Het is de bedoeling de bloedafname steeds voorafgaand te organiseren met het plaatsen van de dieren in de metabole kooi.

SOP 3: Afwegen en toedienen van STZ

Inleiding:

Streptozocine (STZ) zal worden gebruikt om diabetes bij muizen te induceren. De leeftijd van de muizen zal 9 weken zijn. De STZ wordt omschreven als "harmful" en er is "limited evidence of a carcinogenic effect", volgens De stof staat echter vermeld op de lijst van kankerverwekkende stoffen in Nederland. In dit protocol zal beschreven worden welke voorzorgsmaatregelen getroffen moeten worden.

Onderzoeker zal ervoor zorgen dat de stockoplossing (afwegen en oplossen) vers wordt bereid en dat aan de hand van het gewicht van de muis bekend is hoeveel microliters geïnjecteerd moet worden door de biotechnici (200mg/kg in 10mM sodium citraat buffer, pH 4.6). De STZ poeder (in epje met draaidop) zal in een gesloten container naar het CPV getransporteerd worden, alwaar de citraat buffer wordt toegevoegd.

Methode:

1. Weegprotocol:

Voorzorgsmaatregelen

- Laminar Air Flow kast
- Handschoenen
- Protectiebril
- Labjas
- FFP3 masker
- Onder werkveld een disposable absorberend matras

Met de beschermende maatregelen zoals hierboven beschreven zal de streptozocine uit het potje afgewogen worden en verdeeld worden in epjes (met schroefdop). Dit gebeurt in de LAF-kast van de Vervoer van STZ van vriezer naar zal gebeuren in een afgesloten doos met teken "kankerverwekkende stof" crop. Na

afloop van het afwegen zullen het absorberend matras, het FFP3 masker en de handschoenen als chemisch afval worden afgevoerd. Het werkblad zal met chloor worden gereinigd.

Indien er geknoeid wordt zal conform beschreven in het protocol "werken met cytostatica in het CPV" het gemorste materiaal opgeruimd worden met absorberend materiaal en nadien zal het werkblad nog 3x met schoonmaakoplossing worden gereinigd.

2. Oplossen stof:

Voorzorgsmaatregelen

- Laminar Air Flow kast
- Handschoenen
- Protectiebril
- Labjas
- FFP3 masker
- Onder werkveld een disposable absorberend matras

De met stof gevulde epjes zullen naar het CPV vervoerd worden in een afgesloten doos met het teken "kankerverwekkende stof" erop.

In de biohazarkast van het CPV zal de benodigde hoeveelheid natrium citraat worden toegevoegd, conform het protocol "werken met cytostatica in het CPV".

3. Injecteren STZ:

De injecties zullen door medewerkers van het CPV worden gedaan. De dieren moeten 4 tot 6 uur nuchter zijn voor de injectie, om de insuline productie zo laag mogelijk te houden en daarmee de kans op hypoglykemie te voorkomen.

Handelingen:

- Fixeer het dier
- Injecteer de vloeistof intraperitoneaal
- Na injectie krijgen de dieren 10% sucrose water, om hypoglykemie tegen te gaan.

4. Nazorg

Na drie, zeven en veertien dagen zal nuchter glucose bepaald worden om te verifiëren dat de dieren diabetes hebben ontwikkeld. Dit zal geschieden dmv een staartprik.

Als STZ behandelde dieren meer dan 10% is afgevallen, of de glucose >20 mmol/l is, wordt een slow release insuline pellet subcutaan geïmplanteerd.

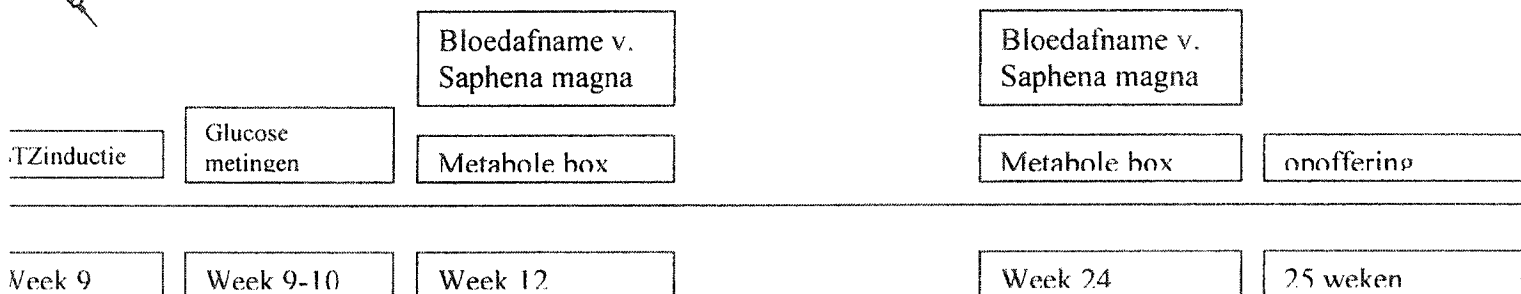
SOP 4: Opoffering van de dieren

- Dieren zijn 25 weken oud
- Door middel van CO₂/O₂ vergassingsmix
- Exsanguinatie door intracardiale punctie

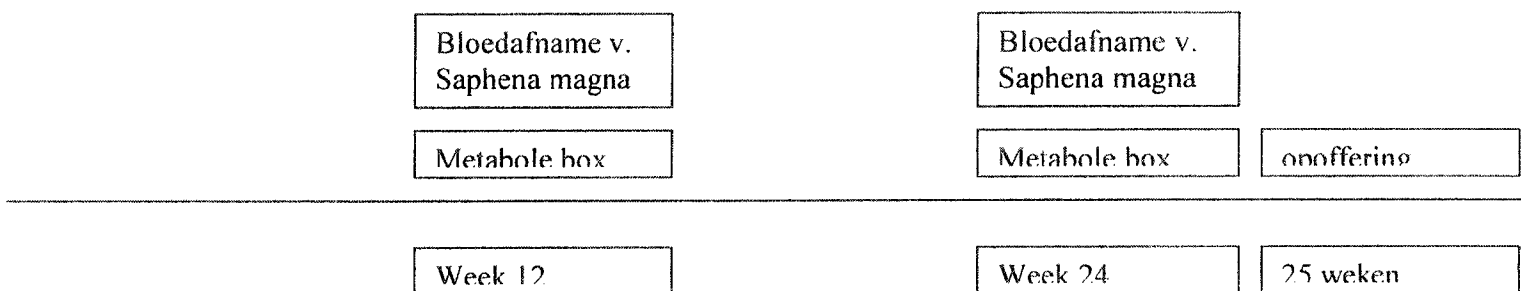
Vervolgens zal op gestandaardiseerde wijze de organen uitgenomen worden voor nadere analyse van mn. Aorta, nieren ect.

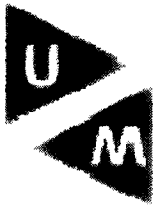


Tijdspad STZ inductie groep.



Tijdspad dieren die geen STZ injectie ondergaan





University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

, voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“Het effect van overexpressie op atherosclerose formatie in ApoE knock-out muizen met en zonder STZ-geïnduceerde diabetes”*, is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a moet voor de groepen met ongerief code 02 aangepast worden code 03 en de groepen met ongerief code 04 moet aangepast worden in code 05.
- Bij punt 6 verzoekt de DEC de eerste 4 regels tot en met “behaald” te verwijderen en in de laatste zin het woordje “intern” ook te verwijderen.
- Bij punt 10b vraagt de DEC zich af of na de initiële STZ toediening er dan in voorzien wordt of er bloedafnames gaan plaatsvinden. Gaarne deze bloedafnames ook bij het ongerief vermelden.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te **passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren**.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-054, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend.

Voorzitter DEC-UM

Geachte DEC commissie,

Bij dezen verzend ik u de aanpassingen aan het DEC protocol 2011-054.

U verzocht mij de volgende punten te adresseren:

- Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a moet voor de groepen met ongerief code 02 aangepast worden code 03 en de groepen met ongerief code 04 moet aangepast worden in code 05.

De ongeriefcodering heb ik aangepast en in grijs aangegeven

- Bij punt 6 verzoekt de DEC de eerste 4 regels tot en met "behaald" te verwijderen en in de laatste zin het woordje "intern" ook te verwijderen.

Deze zinnen heb ik verwijderd.

- Bij punt 10b vraagt de DEC zich af of na de initiële STZ toediening er dan in voorzien wordt of er bloedafnames gaan plaatsvinden. Gaarne deze bloedafnames ook bij het ongerief vermelden.

Er zal inderdaad gecontroleerd moeten worden of de dieren diabetes ontwikkelen. Dit zal geschieden met een prik in de staartvene. Voor het vullen van de glucoseteststrip is slechts een kleine druppel nodig, maar de dieren ondervinden wel ongerief van de afname en dus staat deze nu ook vermeld in de ongerieftabel, in grijs aangegeven.

Ik hoop dat ik u hiermee voldoende heb geïnformeerd. Zo niet, dan hoor ik dat natuurlijk graag.

Met vriendelijke groet,

Promovendus