

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM**DECNR: 2011-132**

Versie 2006

Herziene versie**Ontvangen: 01-11-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
04-11-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
GGO 01-036

LNVCBDNR 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	31961857B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek: Een *in vitro* studie: het onderzoeken van intracellulaire mechanismen in beenmerg- en levermacrofagen die kunnen leiden tot leverontsteking

startdatum 1/12/2011

einddatum⁹ 31/11/2015Duur van de proef¹⁰:

1 dag

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	1
2. Vervanger VO (VVO)				Art.12	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. PI					a

Diergroep	In vitro WT	In vitro CD36-SRA-/-	In vitro LDLr-/-	In vitro Caspase-1 -/-	In vitro NPC1-/-	In vitro Atg7-/-	In vitro Cyp27-/-	
Ctrl/exp/sham	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	
Diersoort	Muis	Muis	Muis	Muis	Muis	Muis	Muis	
Stam	C57/Bl6	C57/Bl6	C57/Bl6	C57/Bl6	C57/Bl6	C57/Bl6	C57/Bl6	
Construct/Mutatie?	-	CD36-SRA-/-	Ldlr-/-	Caspase-1-/-	NPC1-/-	Atg7-/-	Cyp27-/-	
Herkomst (leverancier) *	01/04	01	01/04	05	01	01	05	
Aantal	24	24	24	24	24	24	24	
Geslacht	M/V	M/V	M/V	M/V	M/V	M/V	M/V	
Dieren immuuncompetent?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	
Leeftijd/gewicht	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	31	31	
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01	
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01	
Bijzondere technieken *	02	02	02	02	02	02	02	
Anesthesie *	01	01	01	01	01	01	01	
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01	01	01	
Mate ongerief *	01	01	01	01	01	01	01	
Toestand dieren einde exp *	01	01	01	01	01	01	01	

* VHI-coderingen zie bijlage

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Een *in vitro* studie: Het onderzoeken van intracellulaire mechanismen in beenmerg- en levermacrofagen die kunnen leiden tot leverontsteking.

1. Doel van de proef

Doelstelling:

Inzicht verkrijgen via welke mechanismen cholesterol opname en accumulatie in Kupffer cellen en beenmergmacrofagen kunnen leiden tot leverontsteking, om zo nieuwe targets te identificeren voor mogelijke diagnose, preventie en therapie van NASH.

Achtergrond:

In de huidige Westerse samenleving is er sprake van een aanzienlijke stijging in de incidentie van obesitas. Dit ziektebeeld gaat gepaard met de aanwezigheid van vetaccumulatie in de lever, waardoor steeds meer mensen leverontsteking ontwikkelen (non-alcoholische steatohepatitis, NASH). Op dit moment is er geen optimale diagnostische methode van een ontstoken vette lever beschikbaar in de kliniek waardoor de diagnose pas gesteld kan worden wanneer de lever ernstig beschadigd is. Hierdoor is er ook nog geen specifieke therapie voorhanden. Onze eerdere onderzoeken toonden aan dat de ontsteking zich vooral afspeelt in de levermacrofagen (Kupffer cellen). Deze Kupffer cellen ontwikkelden leverontsteking in muizen nadat ze geactiveerd werden door cholesterolrijke voeding. Verder onderzoek heeft uitgewezen dat voornamelijk de opname van gemodificeerd, geoxideerd cholesterol door Kupffer cellen van belang is bij het ontwikkelen van leverontsteking. Het is bekend dat scavenger receptoren, die aanwezig zijn op het celmembran van macrofagen, cruciaal zijn bij het opnemen van cholesterol, waardoor leverontsteking optreedt.

Eerder hebben wij aangetoond dat actieve immunisatie in muizen leidt tot een verminderde leverontsteking. Dit komt doordat specifieke IgM antilichamen (anti-PC antilichamen) zich binden aan het geoxideerd LDL en samen een immuuncomplex vormen. Op deze wijze kan het geoxideerd LDL niet meer worden opgenomen door scavenger receptoren.

Naast het feit dat opname van cholesterol door Kupffer cellen bijdraagt aan leverontsteking, hebben we ook vastgesteld dat de wijze van cholesterol opslag in de Kupffer cellen een belangrijke rol speelt tijdens het ontstekingsproces. Met name accumulatie in de lysosomen van Kupffer cellen is gerelateerd aan een verhoogde inflammatie. Het exacte mechanisme hoe cholesterolopslag kan leiden tot leverontsteking is op dit moment nog niet bekend. Volgens ons spelen de processen van inflammasome activatie en autofagie een belangrijke rol in de ontwikkeling van leverontsteking tijdens NASH.

Tijdens deze *in vitro* studie willen we de rol van cholesterol opname en accumulatie in macrofagen, en de daarbijbehorende mogelijke mechanismen die leiden tot inflammatie (ie inflammasoom activatie en autofagie), onderzoeken. De genetisch gemodificeerde beenmergmacrofagen en Kupffer cellen zullen geanalyseerd worden op eiwit- en genexpressie, cytokine productie en lipide stapeling na behandelingen met verschillende leverinflammatie gerelateerde stimuli/remmers. Op deze manier kunnen we het effect van verschillende stimuli onderzoeken op onderliggende mechanismen in macrofagen en Kupffer cellen die ten grondslag liggen aan leverinflammatie. Op deze manier zouden we nieuwe targets kunnen identificeren voor mogelijke diagnose, preventie en therapie van NASH.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Metabole verstoringen (waaronder NASH en diabetes), maar ook hart- en vaatziekten zijn

levensbedreigende aandoeningen in onze Westerse samenleving. De incidentie stijgt in de loop der jaren. Tot op heden heeft men het mechanisme achter schuimcelvorming (met vet geladen macrofagen) nog niet ontrafeld. Aangezien deze schuimcellen een belangrijke rol spelen in het ziekte proces van zowel atherosclerose als NASH, is het noodzakelijk om dit mechanisme te ontrafelen, om deze schuimcellen te bestrijden en dus ook NASH.

3. Alternatieven

In vitro experimenten vormen in dit geval een goede aanvulling op onze *in vivo* studie, maar zijn geen vervanging van muismodellen. Voor deze *in vitro* proeven zullen we vooral gebruik maken van uit genetisch gemodificeerde dieren afkomstige cellen. Deze zijn niet op een andere manier te verkrijgen en zijn ongeschikt om in te vriezen. Waar mogelijk zullen deze primaire muiscellen vervangen worden door het gebruik van macrofaag-cellijnen, deze cellijnen vertonen echter niet altijd dezelfde reactie als uit muizen geïsoleerde macrofagen en zijn daarom vaak geen volwaardig alternatief.

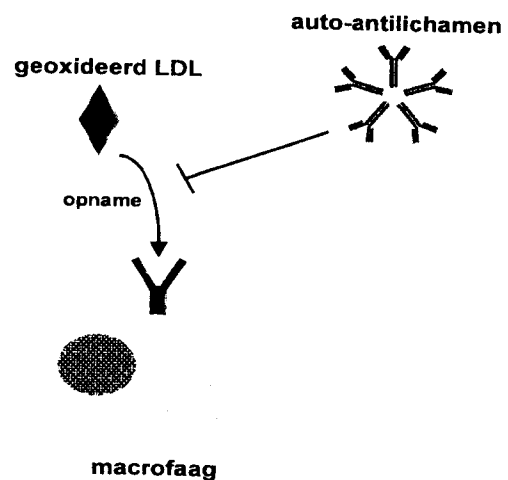
4. Ethische afweging

De exacte etiologie van NASH is tot op heden nog niet bekend. In de huidige samenleving zien we echter een stijging van het aantal gevallen. De prevalentie zal in de toekomst enkel nog stijgen en het is daarom van groot belang om de risicofactoren te ontcijferen om zo tot mogelijke behandelingen te kunnen komen. Het is helaas niet mogelijk om de proeven zonder genetische proefdiermodellen te doen (zie punt 5). Door het gebruik van primaire cellen van deze dieren wordt het aantal proefdieren ook al minder, maar het is nog steeds noodzakelijk om deze proefdieren te gebruiken om te achterhalen wat het verschil in inflammatie veroorzaakt bij deze hyperlipidemische modellen. Op deze manier trachten we het mechanisme van NASH beter in kaart te brengen. Ondanks de mogelijkheid van alternatieven wordt zo veel mogelijk getracht het aantal dieren zo klein mogelijk te houden (door statistische onderbouwing) en het lijden te beperken. De inzichten uit deze dierproef wegen ons inziens enorm op tegen het gebruik en het (minimale) ongerief van de proefdieren, omdat het gebruik van deze dieren een bijdrage zal betekenen voor mogelijke therapieën voor NASH.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

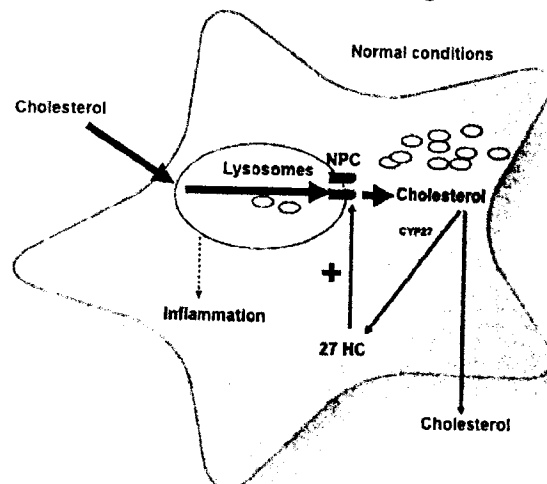
Hoge cholesterol waarden in het bloed zijn verantwoordelijk voor de opname van cholesterol in de Kupffer cellen, waardoor deze cellen gaan lijken op schuimcellen (= macrofagen gevuld met vet). Dit cholesterol kan niet zomaar de macrofaag binnentreden, maar moet eerst gemodificeerd worden (geoxideerd of geacetyleerd), vooraleer het wordt opgenomen door scavenger receptoren op de macrofaag. Het gewone cholesterol (LDL) kan ook via andere wegen worden opgenomen door de macrofagen, namelijk via scavenger receptor onafhankelijke manieren, zoals bv macropinocytose. Opname van geoxideerd cholesterol door de Kupffer cellen, maakt dat de Kupffer cel in een actieve staat komt, wat verder zal leiden tot inflammatoire processen die zich afspelen in de lever.

1) Om de rol van deze schuimachtige Kupffer cellen in leverontsteking te bestuderen, hebben we al eerder een beenmergtransplantatie uitgevoerd met donor beenmerg van muizen die de 2 belangrijkste scavenger receptoren (CD36 en SR-A) niet bezitten. Als acceptormuizen hebben we de hyperlipidemische LDL receptor knock-out muizen gebruikt (DEC2006-177). De resultaten van deze studie hebben aangetoond dat wanneer deze 2 scavenger receptoren niet aanwezig zijn op de beenmergcellen van hyperlipidemische muizen, leverinflammatie ook verminderd is. Echter, de aanwezigheid van schuimachtige Kupffer cellen is nog steeds aanwezig in deze muizen na de voeding van een vetrijk dieet. Verder onderzoek in LDLr^{-/-} muizen heeft aangetoond dat door het 'wegvangen' van geoxideerd cholesterol in het plasma door IgM antilichamen, waardoor geoxideerd cholesterol niet kan worden opgenomen door de scavenger receptoren (zie figuur 1), er minder leverontsteking optrad. Ons eerste doel is dan ook om beenmergmacrofagen en Kupffer cellen *in vitro* te gebruiken waarbij de twee belangrijkste scavenger receptoren CD36 en SR-A uitgeschakeld zijn. Dit om te onderzoeken welke ontstekingsgerelateerde mechanismen worden geremd als geoxideerd cholesterol niet kan worden opgenomen door de macrofagen.



Figuur 1

2) Een ander belangrijk aspect bij het ontwikkelen van NASH, is niet alleen de opname van cholesterol, maar ook de wijze van cholesterol opslag in Kupffer cellen. Zo blijkt uit eigen onderzoek dat wanneer het cholesterol opgeslagen zit in de lysosomen van de Kupffer cellen, er veel meer ontsteking aanwezig is dan wanneer het cholesterol in het cytoplasma van de cel opgeslagen zit. Onder normale omstandigheden wordt cholesterol vanuit het bloed opgenomen door de Kupffer cellen via receptor gemedieerde endocytose. Op deze manier komt het cholesterol terecht in de lysosomen van de Kupffer cellen (zie figuur 2). In de lysosomen zijn veel enzymen aanwezig die het cholesterol bewerken, zodat het de



Figuur 2

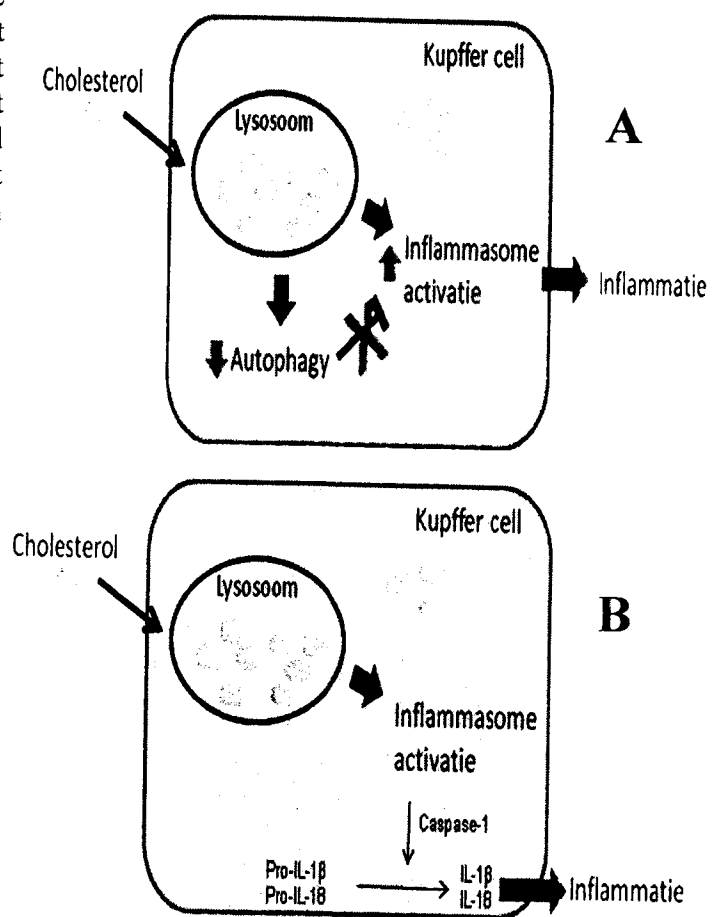
lysosomen kan verlaten via de Niemann-Pick type C (NPC1) transporter. Het cholesterol dat de lysosomen heeft verlaten, kan vervolgens via het CYP27 enzym worden omgezet in 27-hydroxycholesterol (27-HC). Van 27-HC is bekend dat het het cholesterol transport vanuit de lysosomen kan doen versnellen. Omdat de NPC-1 transporter en het enzym CYP27 een cruciale rol spelen in de intracellulaire cholesterol huishouding, gaan we deze genen uitschakelen, om zo het mechanisme van lysosomale cholesterol stapeling en leverontsteking te ontrafelen.

3) Het exacte mechanisme hoe lysosomale cholesterolopslag kan leiden tot leverontsteking is op dit moment nog niet bekend. Uit de literatuur is bekend dat lysosomale cholesterolstapeling invloed heeft op twee processen wat kan leiden tot ontsteking: autofagie en inflammasoom activatie.

Autofagie (=‘zelf-eten’) is een katabool proces wat plaatsvindt als een cel ernstig energietekort heeft. Door eigen cel componenten af te breken door middel van lysosomen, wordt energie vrijgemaakt bedoeld voor de meest essentiële processen van de cel. Via autofagie kan bovendien, door middel van zogenoemde ATG (AuTophagy) eiwitten, vet worden afgebroken in de cel. In verscheidene lysosomale stapelingsziekten, waarbij cholesterol zich opstapelt in lysosomen, vindt er juist verminderde autofagie plaats. Eerder onderzoek toonde aan dat een daling in autofagie kan leiden tot de activatie van deze inflammasomen doordat autofagie het proces van inflammasome activatie remt (Saitoh et al. Nature 2008) (zie figuur 3A).

Inflammasome activatie zal uiteindelijk leiden tot de omzetting van de inactieve cytokines pro-IL-1 β en pro-IL-18 tot hun actieve vorm IL-1 β en IL-18. Deze omzetting komt tot stand door de werking van caspase-1 en zal uiteindelijk leiden tot de vrijzetting van de proinflammatoire cytokines en kan op deze manier ontsteking veroorzaken (zie figuur 3B).

Daarom gaan we voor deze *in vitro* studie Atg7^{-/-} en Caspase-1^{-/-} macrofagen gebruiken om zo een beter inzicht te krijgen via welk proces de lysosomale cholesterol stapeling kan leiden tot leverontsteking in NASH.



Figuur 3A + B

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC-protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI (zie voorblad).

Een project met gelijkaardige experimentele set-up is momenteel ingediend bij de Maag Lever Darm

Stichting (MLDS) en is ook beschreven in een NWO Vidi proposal. Ook is de set-up intern beoordeeld door NUTRIM.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Alle gebruikte diersmodellen zijn muizen. De stammen die gebruikt zullen worden zijn de NPC1^{-/-} en de CD36-SRA^{-/-} die allen afkomstig zijn van Fok UM. Aangezien de CD36-SRA^{-/-} fok een homozygote fok betreft, zullen de wildtype C57/B16 muizen afkomstig zijn van Jackson's Laboratory (via Charles River). De LDLr^{-/-} muizen zijn afkomstig van Fok UM/Jackson's Laboratory (via Charles River). De Caspase-1^{-/-} muizen zijn afkomstig van 1 gen. De atg7^{flox-flox} muizen zijn aanwezig in Fok UM. De Cyp27^{-/-} muizen komen van Hadassah Medical Center (Jerusalem; Israel). Na de proef worden de dieren opgeofferd, waarna Kupffer cellen en beenmergmacrofagen worden geïsoleerd.

7b. Sexe

Voor de uit te voeren experimenten worden beide sexen gebruikt afhankelijk van de beschikbare hoeveelheid dieren.

7c. Aantallen

Met deze studie willen we *in vitro* experimenten gaan uitvoeren met geïsoleerde Kupffer cellen en beenmergmacrofagen. Deze Kupffer cellen en beenmergmacrofagen worden uit 1 muis tegelijkertijd geïsoleerd. Na isolatie, stimuleren we deze cellen *in vitro* met allerlei stimuli, waarna we allerlei parameters gaan meten met het uitvoeren van elektronen microscopie, gen- en eiwitexpressie bepalingen, FACS, en lipidenbepalingen. Voor het kunnen uitvoeren van al deze testen, hebben we Kupffer cellen en beenmergmacrofagen nodig uit een totaal van 4 muizen. Uit eerdere experimenten (b.v. Kanters et al. JCI 2003) is gebleken dat er variatie in tijd is als de experimenten herhaald worden. De eerdere variatie was $\sigma=30$, en met een gemiddeld effect op cytokine productie van $\delta=50$. Dit levert (met Sachs of PS program) $n=6$ herhalingen op (er is praktisch geen uitval bij deze proeven). Echter, de praktijk kan uitwijzen dat we bij bepaalde experimenten/modellen met minder herhalinge toekunnen. We vragen dus dieren aan voor 6 herhalingen omdat de statistiek met onze eerdere experimenten dat aangeeft maar het zou kunnen dat we in bepaalde gevallen met minder herhalingen kunnen volstaan. In dat geval zullen er dus minder dieren gebruikt worden.

Berekening: 4 muizen x 6 herhalingen = 24 muizen per groep.

In totaal komen we dus uit op:

- 24 wildtype C57/B16 muizen
- 24 CD36-SRA^{-/-} muizen
- 24 LDLr^{-/-} muizen
- 24 Caspase-1^{-/-} muizen
- 24 NPC1^{-/-} muizen
- 24 Atg7^{-/-} muizen
- 24 Cyp27^{-/-} muizen

Dierproef

8. Experiment

De dieren worden op standaard chow voer en water gehouden en zullen niet *in vivo* worden behandeld. Voor het isoleren van Kupffer cellen zal de lever uit de muis worden geïsoleerd voor de vervolgpcedure. Voor het isoleren van beenmerg macrofagen worden de botjes *femur* (dijbeen) en *tibia* (scheenbeen) uit deze muizen geïsoleerd.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er wordt geen anesthesie toegepast aangezien dit niet nodig is omdat we dieren zonder voorgaande behandeling op een gecontroleerde manier opofferen.

9b. Pijnbestrijding

Pijnbestrijding is niet nodig bij deze experimenten.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

We verwachten geen ongerief bij dit experiment, niet vanwege het transgeen zijn en ook niet aangezien er bij de proefdieren geen experimentele handelingen worden uitgevoerd. De dieren zullen op een verantwoorde manier geëuthanaseerd worden. Mochten de dieren toch klinische verschijnselen vertonen die indicatief zijn voor ongerief (zie humane eindpunten) worden ze geëuthanaseerd.

Humane eindpunten: De dieren zullen eventueel voortijdig gedood worden als ze geen exploratief gedrag meer vertonen, niet meer eten of drinken, geen urine/feces meer produceren of als hun lichaamsgewicht afneemt met 20% tov het begintijdpunt..

Euthanasie zal plaatsvinden door cervicale dislocatie onder sedatie (1.5% isoflurane via inhalatie) of O₂/CO₂ euthanasie.

Zorg

10a. Ongerief

De dieren die zullen worden gebruikt, worden in groepsverband gehuisvest en gehouden op standaard voer en water en zullen niet *in vivo* worden behandeld. We verwachten geen ongerief bij dit experiment, maar de mogelijkheid bestaat dat de dieren afwijkingen vertonen (bv olifantstanden), waardoor ze toch symptomen van ongerief vertonen (zie ook punt 9c voor humane eindpunten).

10b. Welzijnsevaluatie

De dieren die zullen worden gebruikt, worden gehouden op standaard voer en water en zullen niet *in vivo* worden behandeld. In eerdere experimenten van onze afdeling werden geen duidelijke tekenen van ongerief bemerkt.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen sociaal gehuisvest worden in het CPV van de UM onder standaard condities met vrij toegang tot water en voer en een normaal dag/nacht ritme.

12. Deskundigheid

Binnen de _____ zijn er voldoende mensen die deskundig zijn in het isoleren van beenmergmacrofagen en Kupffer cellen. Er wordt met deze mensen samengewerkt.

De bevoegde personen zijn allen in bezit van artikel 9 en/of 12.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Isolatie beenmerg-macrofagen:

1. Cut off the hind legs after removing the skin.
2. Isolate femurs and tibia from the mice and remove most of the skeletal muscles (note 3).
3. Put the bones in PBS, keep on ice and take to flow cabinet.
4. Sterilize the bones by submerging them for 30 seconds in 70% ethanol in a petri dish.
5. Transfer to sterile PBS in a petri dish.
6. Take a bone between forceps, cut off the ends and flush the bone using PBS by inserting a 25G needle at one end.
7. Collect bone marrow in a 50ml tube.
8. Repeat previous steps for all the bones.
9. Make the bone marrow cell suspension single cell by first passing it through a 19G needle, transfer it to a new tube and then pass it through a 25G needle.
10. Count the cells.
11. Spin the cells down at 1000rpm, 5 min at 4°C.
12. Resuspend the cells in RPMI 1640 / 2% FCS / 5U/ml heparin at a density of 5×10^7 cells/ml and keep on ice.

Opofferen:

De opoffering gebeurt dmv cervicale dislocatie of O₂/CO₂ verstikking.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

.....
.....

1, voorzitter

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon:

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“Een in vitro studie: het onderzoeken van intracellulaire mechanismen in beenmerg- en levermacrofagen die kunnen leiden tot leverontsteking”*, is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

- De DEC merkt op dat de ethische afweging (punt 4), geen afweging is en verzoekt dit aan te vullen.

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 2011-132, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

.....
Voorzitter DEC-UM



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:

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *"Een in vitro studie: het onderzoeken van intracellulaire mechanismen in beenmerg- en levermacrofagen die kunnen leiden tot leverontsteking"*, is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

- De DEC merkt op dat de ethische afweging (punt 4), geen afweging is en verzoekt dit aan te vullen.

- Dit is aangepast. De aanvulling is als volgt (d.d. 01-11-2011):

"Ondanks de mogelijkheid van alternatieven wordt zo veel mogelijk getracht het aantal dieren zo klein mogelijk te houden (door statistische onderbouwing) en het lijden te beperken. De inzichten uit deze dierproef wegen ons inziens enorm op tegen het gebruik en het (minimale) ongerief van de proefdieren, omdat het gebruik van deze dieren een bijdrage zal betekenen voor mogelijke therapieën voor NASH."

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 2011-132, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
07-11-2011

Project: *Een in vitro studie: het onderzoeken van intracellulaire mechanismen in beenmerg- en levermacrofagen die kunnen leiden tot leverontsteking.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):*Secretariaat DEC-UM*

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-132
Diersoort: muis
Aantal dieren: 168
Einddatum: 04-11-2015

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM