

64

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM Versie nov. 2005 Herziene versie	DECNR: 2011-142 Ontvangen: 14-11-2011
--	--

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR³	LNV/CBDNR⁴
16-11-2011	Herzien	GGO-02-223	

Hoofdproject	CARIM					
---------------------	-------	--	--	--	--	--

Deelproject	3					
--------------------	---	--	--	--	--	--

Financieel beheerder	Budgetnummer 3098 3293B
-----------------------------	--------------------------------

Titel van het onderzoek:

Fysiologische ontwikkeling van pups na intra-uterine renine stimulatie.

startdatum 01-11-2011
einddatum ⁹ 01-11-2015
Duur van de proef¹⁰: 24 weken

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

Diergroep	1	2	3	4		
ctrl/exp/sham	Exp.+ Controle (moeder)	Pups Exp Dag 0/1	Pups Exp + Cont na 12 weken	Controle (man)		
Diersoort	02	02	02	02		
Stam	CyplaImRen2	CyplaImRen2	CyplaImRen2	CyplaImRen2		
Construct / mutatie ?	Geen drager	mRen2 insert	mRen2 insert	mRen2 insert		
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01		
Aantal	9	27	42	2		
Geslacht	v	m	m	m		
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja		
Leeftijd/gewicht	adult	1 dag	12 weken	adult		
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 *	04	04	04	01		
Pijnbestrijding *	01	04	04	01		
Mate ongerief *	02	02	04	01		
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01		

* VHL-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Fysiologische ontwikkeling van pups na intra-uterine renine stimulatie.

1. Doel van de proef.

Er is steeds meer wetenschappelijke evidentie dat prenatale aanlegstoornissen in het latere leven tot functiestoornissen kunnen leiden^{1,2,3}. Ook op het gebied van cardiovasculaire ziekten zijn dit soort feiten vastgesteld. Recent hebben we aangetoond dat transiente stimulatie van het renine gen in een rat tussen 4-8 weken na de geboorte tot permanente hypertensie leidt⁴. In het huidige onderzoek willen we nagaan of een prenatale stimulatie van het renine gen tot gelijke consequenties leidt en zo ja wat het mechanisme daarvan is. We willen hierbij gebruik maken van de transgene Cypla1mRen2 rat. In deze rat is de activiteit van het muizenrenine gen gekoppeld aan het Cypla1 P450 systeem zodat na toevoeging van een leverenzym inductor zoals indole-3-carbinol (I3C) de lever renine gaat afgeven aan de circulatie en binnen enkele dagen tot hypertensie leidt. Omdat het I3C getransporteerd kan worden over de placenta (zie referentie) is het in theorie mogelijk om via transiente toediening van dit voedseladditief aan een zwangere/zogende moeder, het renine gen te activeren in de zich ontwikkelende foetus en de cardiovasculaire consequenties daarvan op latere (adulte) leeftijd vast te stellen. Transplacental exposure to indole-3-carbinol induces sex-specific expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the liver of Fischer 344 neonatal rats. Larsen-Su SA, Williams DE. Toxicol Sci. 2001 Dec;64(2):162-8.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

De klinische naamgeving van hoge bloeddruk bij de mens is essentiële hypertensie. De typering essentieel geeft aan dat de oorzaak in vele (90%) gevallen onbekend is. Meerdere theorieën geven aan dat een prenatale ontwikkelingsstoornis mogelijk ten grondslag kan liggen aan het optreden van cardiovasculaire ziekte op volwassen leeftijd. We willen met de volgende proeven deze bewering staven. Ten eerste; volgens de Barker theory leiden verstoringen tijdens de ontwikkeling van de foetus tot consequenties voor op latere leeftijd^{1,2,3}. Foetussen die intra-uteriene een groei-restrictie hebben doorgemaakt hebben de neiging om op latere leeftijd overgewicht te ontwikkelen en ook is er een associatie met hypertensie³. Het lijkt zo te zijn dat de foetus zich voorbereid op het latere leven en compensatie mechanismen aanzet die langdurig actief blijven. Mogelijk is hierbij het renine angiotensine systeem betrokken en niet alleen verantwoordelijk voor het cardiovasculaire maar ook zelfs het metabole fenotype. Ten tweede laat recent onderzoek van Baumann⁵ et al. zien dat transiente inhibitie van het renine angiotensine systeem in spontaan hypertensieve ratten op jonge leeftijd voordat er al echt hoge bloeddruk is tot een langdurige onderdrukking van de hypertensie ontwikkeling leidt. Omgekeerd toont het gepubliceerd onderzoek van Heijnen⁴ et al. aan dat stimulatie van het renine tijdens een leeftijd van 4-8 weken op latere leeftijd net langdurig hypertensie induceert waarbij vooral de nier het orgaan is dat de meeste schade ondervindt. Ten derde is bekend dat toediening van ACE-remmers en AT1-receptor blokkers tijdens de zwangere periode tot teratogene effecten leidt⁷. Vooral de nieren worden dan slecht ontwikkeld. Bovengenoemde onderzoeken indiceren dat de activiteit van het renine angiotensine systeem tijdens de foetale ontwikkeling cruciaal is voor de latere ontwikkeling van de bloeddruk. Het induceerbare transgene ratten model biedt de mogelijkheid om nu voor het eerst de cardiovasculaire consequenties van renine activatie tijdens de foetale ontwikkeling te bestuderen. In dit onderzoek willen we ons vooral concentreren op de cardiovasculaire gevolgen, maar zullen metabole en gedragsmatige consequenties niet uit het oog verliezen. Daarom zullen we naast het meten van cardiovasculaire parameters ook enkele metabole en gedragsmatige parameters nader willen uitlezen.

3. Alternatieven

Er is voor dit onderzoek geen alternatief voor handen voor het gebruik van proefdieren. Zwangerschap is niet in vitro na te bootsen en het onderzoek richt zich op het complexe samenspel van verschillende systemen die betrokken zijn bij de regulatie van de bloeddruk.

4. Ethische afweging

Hart- en vaatziekte vormen een van de belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld. Waarbij zowel in ontwikkelde landen als in ontwikkelingslanden vertoont 25 a 35 % van de volwassenen essentiële hypertensie (tijdschr Cardiol – jaargang 17, nr 6, oktober 2005). Een groter inzicht in de prenatale factoren die kunnen leiden tot een pathologische programmering van cardiovasculaire ziekten kan later weer bijdragen tot een betere bestrijding van hoge bloeddruk. Tot nu toe wordt hoge bloeddruk symptomatisch bestreden en is het nodig om dagelijks een pil in te nemen. We hopen dat dit type onderzoek ertoe kan leiden dat er een curatieve behandelingstrategie voor hypertensie ontwikkeld kan worden. We vinden daarom dat het ongerief dat de proefdieren wordt aangedaan ondergeschikt is aan het wetenschappelijk belang.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Recent werk van [] laat zien dat toevoeging van I3C aan het voedsel gedurende week 4-8 in transgene ratten met het cyp1a1-mRen2 construct blijvend de bloeddruk verhoogt. Terwijl bij ratten die op volwassen leeftijd transient worden gestimuleerd de bloeddruk weer normaliseert. De vraag is dus of een activatie op nog jongere leeftijd tot een zelfde fenotype leidt. De literatuur geeft geen op dit moment geen inzicht in de manier waarop de pups zich zullen ontwikkelen. Er kunnen echter wel mogelijke scenario's geschetst worden. De voeding (I3C) schakelt alleen bij de mannelijke pups het construct aan, met als waarschijnlijk gevolg een intrauterine groeiachterstand (en mogelijk al hogere bloeddruk). Na de geboorte kan er dan catch-up groei plaatsvinden en mogelijk ontstaat er een obese fenotype met hoge bloeddruk. Een andere mogelijkheid is dat het construct nog niet op zo'n jonge leeftijd geactiveerd kan worden en dat er dus geen pathologie ontstaat. Om dit te controleren willen we op het einde van het toedienen van I3C behandelde en onbehandelde dieren vergelijken en in de lever de mate van transcriptie van het renine gen meten. Tevens zal in die dieren, bloedvaten, nieren en hart histologisch worden onderzocht om de vraag te beantwoorden of vroege stimulatie een permanente verandering heeft geïnduceerd. Mocht dit zo zijn dan ligt voor de hand om dan naar DNA methylering en andere epigenetische factoren te gaan kijken. Een mogelijke optie is dat de mannelijke foetussen zo'n hoge bloeddruk ontwikkelen dat dit hen fataal wordt. Omdat dit nog niet bekend is kunnen wij hier ook nog concrete uitspraak over doen en zou slechts het experiment zelf deze vragen kunnen beantwoorden.

Wetenschap

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de principal investigator van

Proefdier

deze onderzoekslijn

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor deze experimenten zal gebruik gemaakt worden van zwangere cplal mRen2 ratten die hier lokaal worden gefokt.

7b. Sexe

Er zal gebruik worden gemaakt zwangere vrouwen. Omdat het genetisch construct alleen in mannen aanwezig is (op Y chromosoom) wordt in het onderzoek naar de lange termijn effecten de mannelijke off-spring onderzocht.

7c. Aantallen

Omdat we helemaal niet weten of er wel pups geboren gaan worden en of de behandeling met I3C effect gaat hebben willen hanteren we een groepsgrootte die gebruikelijk is in de piloot fase van het dierexperimenteel onderzoek. We willen graag de volgende aantallen aanvragen.

- 1) om te testen of de I3C behandeling via de moeder inderdaad in de lever het renine gen van de foetale dieren activeert en prenatale effecten heeft op organen willen we eerst van 3 behandelde en onbehandelde moeders ($n=6$) de foetussen onderzoeken op de dag van de geboorte. Uitgaande van 3 mannelijke foetussen per zwangerschap hopen we hiermee voldoende gegevens te kunnen verzamelen. Deze mannelijke pups zijn daarom als een aparte groep opgenomen. Omdat de andere pups dan overbodig zijn is op het voorblad het aantal dieren weergegeven de I3C behandelde moeders $3 \text{ (moeders)} * 7 \text{ (pups/nest)} = 21$ pups, waarvan 9 mannelijke dieren zullen worden getest ($21/9$). Deze zijn in kolom 3 vermeld.
- 2) Om de lange termijn effecten te kunnen bepalen willen we de studie gefaseerd uitvoeren. We zullen in principe dezelfde moeders gebruiken als in studie 1, maar nu in een cross-over studie (een keer met en een keer zonder I3C) We denken dat we met de pups van 3 behandelde moeders voldoende indicatie kunnen krijgen of er tijdens de ontwikkeling van de dieren effecten van de prenatale behandeling zijn opgetreden. Als controle moeten we hierbij ook de mannelijke pups van 3 onbehandelde dieren meenemen ($n=6$) Mochten de aantallen mannetjes door de I3C behandeling minder zijn dan normaal dan zullen we contact opnemen met de DEC om te vragen of we het aantal moeders met I3C behandelingen kunnen opvoeren opdat we tenminste 9 mannelijke pups hebben om te kunnen vervolgen. Ook omdat niet weten of alle zwangerschappen lukken vragen we hierbij $n=9$ moeders in totaal aan. We zullen er eerst maar 6 behandelen. Mocht er postnataal ook uitval zijn dan zullen we dit melden en ook meer dieren gaan inzetten. Omdat het hier 6 moeders betreft $* 7$ pups/nest hebben we hier op het voorblad 42 vermeld.
- 3) In deze proefopzet kiezen we voor een maximale dosering I3C (0.6% in het voer). Mocht dit leiden tot de observatie dat er geen mannelijke dieren geboren worden dan willen we de dosering van I3C een factor 3 verlagen en de proef opnieuw uitvoeren (zelfde aantal $n=3$). In het experiment zal op het moment van de geboorte de nestgrootte worden teruggebracht naar 6 om een eerlijke vergelijking van de ontwikkeling van de pups te kunnen maken. De pups zullen vervolgens tot 12 weken na de geboorte worden vervolgd en aan verschillende experimenten worden blootgesteld. Daarom hebben we deze pups als een tweede aparte groep opgenomen. De pups in deze groep zullen namelijk allemaal het zelfde protocol ondergaan. Het verschil zit hem hopelijk alleen in de prenatale behandeling.

5 Dierproef

8. Experiment

De 6 moeder ratten zullen random in 2 groepen worden ingedeeld. We willen de 6 dieren op nivo nul zwanger laten worden omdat we de moeders een 2^{de} keer willen bestuderen tijdens de zwangerschap (een keer met een en keer zonder I3C toediening). De andere 3 dieren houden we in de fok achter de hand en roepen ze op als de moeders op nivo nul niet zwanger worden. Met de cross-over design zijn ook 2 vruchtbare mannen nodig. Deze zijn in een aparte groep opgenomen. Als de moeders zwanger zijn krijgen ze 0.6% I3C aan het voer toegevoegd. In het laatste trimester van de dracht (tussen dag 15-19) zal een echo worden gemaakt om te kijken of er sprake is van een vorm van groeiretardatie of andere afwijkingen in utero. A terme worden de pups gemeten (+ gewicht en sexe bepaald) en zal de nestgrootte teruggebracht worden naar n=6. De dieren die hier overblijven (geschat op 1 / nest) zijn extra bij groep 3 opgeteld. Dus $21 + 6 = 27$.

De pups die op dag 1 worden opgeofferd voor nadere chemische en histologische analyse zullen worden gedood door decapitatie en direct hieropvolgend door het hoofd in de vloeibare stikstof in te vriezen. De moeders van deze dieren worden gedood (i.p. pentobarbital) en de placenta en uterus wordt onderzocht of de I3C voeding ook hier mogelijk effect op heeft gehad.

De moeders van de pups die we oud willen later worden blijven dan tot 10 dagen na de geboorte I3C krijgen. De pups eten op dat moment nog geen vast voedsel zelf en zijn dan nog volop in ontwikkeling. De totale behandelingsduur met I3C is daarmee ongeveer 4 weken. Wanneer de dieren worden gespeend zal de moeder worden nogmaals worden gebruikt maar dan in de cross-over situatie (niet behandeld of I3C)

In de pups zullen we dan, zoals aangegeven in het schema, regelmatig enkele metingen uitvoeren:

De dieren worden wekelijks gewogen.

Vanaf week 4 zal 2 wekelijks de staartbloeddruk worden gemeten

Vanaf week 4 zal 4 wekelijks een echo van het hart worden gemaakt

Vanaf week 4 zal 4 wekelijks de dieren in een metabole kooi worden geplaatst om 24 uurs voedsel, water inname, en urine productie te monitoren.

Op het einde van week 11 zal een katheder worden ingebracht in de femorale arterie om in het begin van week 12 in wakkere conditie de bloeddruk te verifiëren.

Op het eind van week 12 zal een hemodynamische eindmeting worden uitgevoerd om de hartfunctie in detail te karakteriseren en daarna worden de dieren geofferd en organen geoogst voor verdere analyse.



Aantal weken	Acties
-3	- Start met speciale voeding waardoor het construct zal worden geactiveerd.
-2	- Moeder wegen
-2	- echo thv inzicht in de ontwikkeling van de pups
0	A terme, nest terug brengen naar n=6 (rest analyseren)
	- pups wegen
	- pups sexen
2	- Stop met speciale voeding (10 dagen na bevalling)

3	- offeren van 3 controle en 3 experimentele nestjes
4-12	Tot week 3 aan spenen - Meten van de bloeddruk dmv. tailcuff meting (4-6-8-10-12 wk) - 24 h plaatsen in metabole kooi (4-8-12 wk) - regulier wegen (ieder week) - echo t.b.v. cardiale ontwikkelingen (4-8-12 wk) - Open veld gedragstest (week 5 - 9)
11	-plaatsen van een bloeddruk canule
12	-hemodynamische eindmeting en offeren van de pups

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De echo's worden uitgevoerd onder isofluraan anesthesie, dit geldt ook voor het plaatsen van de bloeddruk canule. Bij de andere zaken is geen narcose vereist.

9b. Pijnbestrijding

Voor de implantatie van de arteriële katheters in de dieren van groep 3 zal buprenorfine (0.05 mg/kg) s.c. worden gegeven. 8-12 uur later zal dit worden herhaald.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

We verwachten geen ziektebeelden tijdens de zwangerschap van de moeder. I3C is een natuurlijk voorkomend middel en heeft in controle studies tot nu toe nog nooit een effect laten zien.

Wat betreft de pups is er geen voorspelling te doen. We zullen als gewoonlijk de integriteit van het proefdier respecteren en in overleg met de betrokken 12 en ook de art. 14 functionaris beoordelen of er ondraaglijk lijden is. Tijdens de behandeling tussen 4-8 weken met I3C zien we een gewichtsafname en is er een verhoogde kans op een hersenbloeding. Dus een 25% afname van het lichaamsgewicht kan dan hier als humaan eindpunt worden opgenomen. Als andere gedrags-, en of fysiologische afwijkingen belemmerend zijn (verstoorde locomotor activiteit t.g.v. hersenbloeding, niet kunnen eten of drinken) en daarom niet opwegen tegen het doel van de proef zullen de proefdieren vervroegd het eindexperiment ondergaan. Ook wanneer de moeder de pups negeert zal de proef worden beëindigd.

Euthanasie van de pups vindt plaats door capitatie en bevriezing van het hoofd in vloeibare stikstof. Euthanasie van de 12 weken oude dieren vindt plaats onder isofluraan anesthesie in combinatie met verbloeden zal plaatsvinden door verbloeden.

Euthanasie van de moeders en 2 vaders zal gebeuren door een i.p. injectie van pentobarbital (200 mg/kg) na afloop van de studie.

Zorg

10a. Ingreep/Interventie	Duur	Ongerief code	Frequentie
MOEDERS			
Echo	30 min.	02	4
Euthanasie	2 min	02	1
VADERS			
Euthanasie	2 min	01	1

Zorg

10a. Ingreep/Interventie	Duur	Ongerief code	Frequentie
PUPS 1 dag			
euthanasie	2 min	02	1
PUPS 12 weken			
Echo	30 min.	02	4
Tailcuff	30 min	03	5
Metabole kooi	24 uur	03	3
Gedragmeting	1 uur	02	2
Art.canule	24 uur	04	1
Eindmeting	2 uur	02	1

11. Verzorging en huisvesting

Verzorging en huisvesting vinden plaats volgens de normen van de Centrale proefdiervoorziening (UM), . De dieren worden sociaal gehuisvest, water en voer ad libidum verstrekt. Verantwoordelijke voor de proefdieren:

Eerst verantwoordelijke:

Tweede:

De experimenten worden verricht in dierenlab 4.219 bij farmacologie

De art. 14 functionaris wordt ingelicht in geval van calamiteiten

12. Deskundigheid

De echocardiografie, implantatie van de canule, en eindmeting zal worden uitgevoerd door een van de art. 12 van de . De gedragsmeting zal worden uitgevoerd

door een art 12 functionaris van

13. Standard Operation Procedures (SOP)

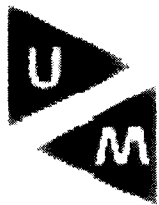
Far-01R

Far-02R

Far-07R

REFEENTIES

- 1: Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: Insights into adult cardiovascular disease. Life Sci. 2011 Sep 26;89(13-14):417-21. Rogers LK, Velten M.
- 2: Fetal and infant origins of cardiovascular disease. Midwifery Volume 10, Issue 2, June 1994, Pages 61-6
- 3: Intrauterine growth restriction and shallower implantation site in rats with maternal hyperinsulinemia are associated with altered NOS expression. Placenta. 2009 Oct;30(10):898-906.
4. Transient renin-angiotensin system stimulation in an early stage of life causes sustained hypertension in rats. J. Hypertension (in press). Bart F.J. Heijnen, Carine J. Peutz-Kootstra, John J. Mullins, Ben J.A. Janssen and Harry A.J. Struijker-Boudier
5. Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age. Baumann M, Janssen BJ, Hermans JJ, Peutz-Kootstra C, Witzke O, Smits JF, Struijker Boudier HA. J Hypertens. 2007 Jan;25(1):207-15.
6. Early Life Stress Enhances Angiotensin II-Mediated Vasoconstriction by Reduced Endothelial Nitric Oxide Buffering Capacity. Hypertension. 2011 Oct;58(4):619-26. Epub 2011 Aug 29. Loria AS, Kang KT, Pollock DM, Pollock JS.
7. Fetopathy associated with exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. Early Hum Dev. 2006 Jan;82(1):23-8. Quan A.



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, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Fysiologische ontwikkeling van pups na intra-uterine renine stimulatie*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * De DEC verzoekt op het voorblad het aantal dieren tussen haakjes te verwijderen. De code voor pijnbestrijding van de groepen 3 en 4 aanpassen in code 04. Pups zoals hier bedoeld dient te worden geschreven met een p "pups", gaarne aanpassen op het voorblad en in de gehele aanvraag!
- * Volgens de DEC is bij punt 5 een alinea weggevallen achter "of vroege stimulatie". Foeten moet "foetussen" zijn!
- * Bij punt 7b verzoekt de DEC het woordje "vooral" te verwijderen in de voorlaatste zin.
- * Punt 8- De pups die direct geëuthanaseerd worden dienen in een aparte kolom op het voorblad vermeld te worden (minder ongerief).
- * Punt 9c- De DEC verzoekt te humane eindpunten meetbaar te definiëren op basis van mogelijk te verwachten effecten bij mannelijke dieren en algemene houding/indruk en gewicht.
- * Punt 10a- De DEC verzoekt het ongerief per groep te specificeren (ook op het voorblad) en te sommeren. De DEC schat het totale ongerief in op code 04.
- * De DEC vraagt zich af wat de noodzaak is om de moeders direct na de geboorte op te offeren. Indien dit niet nodig is, kunnen de moeders eventueel eerst gebruikt worden voor de controle pups en vervolgens voor de behandelingsgroep.

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 2011-142, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend.

Voorzitter DEC-UM

Geachte DEC

Hierbij mijn antwoorden op uw suggesties naar aanleiding vna mijn projectaanvraag: “*Fysiologische ontwikkeling van pups na intra-uterine renine stimulatie*”, is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

Ik zal in grijs achter uw volgende punten mijn antwoord zetten.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt op het voorblad het aantal dieren tussen haakjes te verwijderen. De code voor pijnbestrijding van de groepen 3 en 4 aanpassen in code 04.
Pups zoals hier bedoeld dient te worden geschreven met een p “pups”, gaarne aanpassen op het voorblad en in de gehele aanvraag! Dit is aangepast volgens instructie.
- Volgens de DEC is bij punt 5 een alinea weggevallen achter “of vroege stimulatie”.
De zin luidt nu: *Tevens zal in die dieren, bloedvaten, nieren en hart histologisch worden onderzocht om de vraag te beantwoorden of vroege stimulatie een permanente verandering heeft geïnduceerd. Mocht dit zo zijn dan ligt voor de hand om dan naar DNA methylering en andere epigenetische factoren te gaan kijken.*
Foeten moet “foetussen” zijn! Dit is aangepast volgens instructie
- Bij punt 7b verzoekt de DEC het woordje “vooral” te verwijderen in de voorlaatste zin. Dit is aangepast volgens instructie
- Punt 8- De pups die direct geëuthanaseerd worden dienen in een aparte kolom op het voorblad vermeld te worden (minder ongerief). Staan verzameld in kolom 2
- Punt 9c-De DEC verzoekt te humane eindpunten meetbaar te definiëren op basis van mogelijk te verwachten effecten bij mannelijke dieren en algemene houding/indruk en gewicht.
De volgende tekst is opgenomen:
Dus een 25% afname van het lichaamsgewicht kan dan hier als humaan eindpunt worden opgenomen. Als andere gedrags-, en of fysiologische afwijkingen belemmerend zijn (verstoorde locomotor activiteit t.g.v. hersenbloeding, niet kunnen eten of drinken) en daarom niet opwegen tegen het doel van de proef zullen de proefdieren vervroegd het eindexperiment ondergaan. Ook wanneer de moeder de pups negeert zal de proef worden beëindigd.
- Punt 10a- De DEC verzoekt het ongerief per groep te specificeren (ook op het voorblad) en te sommeren. De DEC schat het totale ongerief in op code 04. Dit aangepast conform instructie op het voorblad. De tabel is is nu als volgt:

10a. Ingreep/Interventie	Duur	Ongerief code	Frequentie
MOEDERS			
Echo	30 min.	02	4
Euthanasie	2 min	02	1
VADERS			
Euthanasie	2 min	02	1
PUPS 1 dag			
euthanasie	2 min	02	1
PUPS 12 weken			
Echo	30 min.	02	4
Tailcuff	30 min	03	5
Metabole kooi	24 uur	03	3
Gedragsmeting	1 uur	02	2
Art.canule	24 uur	04	1
Eindmeting	2 uur	02	1

- « De DEC vraagt zich af wat de noodzaak is om de moeders direct na de geboorte op te offeren. Indien dit niet nodig is, kunnen de moeders eventueel eerst gebruikt worden voor de controle pups en vervolgens voor de behandelingsgroep.

Dit is een goed punt. Ik ben blij met dit commentaar. Het brengt de genetische variatie terug. We hebben nu gekozen voor een cross-over design en een groep vrouwen weggelaten (minder proefdieren). Dit is op verschillende punten in de aanvraag beschreven. Omdat de dieren op nivo NUL zwanger worden hebben we 2 mannen aangevraagd om inderdaad de zwangerschap te kunnen laten induceren in dezelfde vrouwen. Deze zijn in een aparte kolom nu opgenomen.

Aanpassingen in de tekst:

We zullen in principe dezelfde moeders gebruiken als in studie 1, maar nu in een cross-over studie (een keer met en een keer zonder I3C)

We willen de 6 dieren op nivo nul zwanger laten worden omdat we de moeders een 2^{de} keer willen bestuderen tijdens de zwangerschap (een keer met een en keer zonder I3C toediening). De andere 3 dieren houden we in de fok achter de hand en roepen ze op als de moeders op nivo nul niet zwanger worden. Met de cross-over design zijn ook 2 vruchtbare mannen nodig. Deze zijn in een aparte groep opgenomen

Ik hoop dat ik hiermee uw vragen voldoende te hebben beantwoord.

In afwachting van uw antwoord

Met vriendelijke groet

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
16-11-2011

*Project: Fysiologische ontwikkeling van pups na intra-uterine renine
stimulatie.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

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: 2011-142

Diersoort: muis

Aantal dieren: 80

Einddatum: 16-11-2015

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

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043*Maastricht*
01-12-2011

Correctie op brief 628-11/dd. 16-11-2011 (onjuiste vermelding van diersoort).

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM*Project: Fysiologische ontwikkeling van pups na intra-uterine renine
stimulatie.*p/a secretariaat DEC-UM
Secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Bezoekadres

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat
voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik
voldoet.De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals
aangevraagd en geeft een positief advies.*Postadres*
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-142

Diersoort: ratten

Aantal dieren: 80

Einddatum: 16-11-2015

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