

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM Versie 2006 Aangepast voorblad	DECNR¹: 2011-053 Ontvangen: 20-07-2011
---	--

DEC datum goedkeuring ⁶	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
25-05-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot	02-154-03	

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

Deelproject		1					
-------------	--	---	--	--	--	--	--

Financieel beheerder	Budgetnummer 319619898
----------------------	------------------------

Titel van het onderzoek:

startdatum April 2011
 einddatum ⁹ Januari 2012
 Duur van de proef 10: 24 weken

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1A.Verantwoordelijk onderzoeker (VO) Maastricht			Art.9	
1B.Verantwoordelijk onderzoeker (VO) Nijmegen			Art.9	
2A. Vervanger VO (VVO) Maastricht			Art.9	
2B. Vervanger VO (VVO) Nijmegen			Art.9	
3. Verantwoorde-lijk medewerker (VM) GGO ⁷ Maastricht			Art.9	
4. overige uitvoerenden (1)			Art.9	
5. overige uitvoerenden (2)			Art.9	
6. overige uitvoerenden (3)			Art.9	

Diergroep	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4	5a	5b	6a	6b
ctrl/exp/sham	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Optimalisatie MRI / MRS	Exp	Exp	Exp	Exp
Diersoort	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Stam	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Construct / mutatie ?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Aantal	11	11	13	13	9	9	8	22	22	6	6
Geslacht	M	M	M	M	M	M	F	F	F	M	M
Dieren immuuncompetent ?	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a	ja/nee ^a
Leeftijd in weken	11-13	11-13	11-25	11-25	11-13	11-13	12-25	5-18	5-18	5-18	5-18
Doel van de proef *	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	02	02	01	01	01	01	01	01	01	02	02
Anesthesie *	01	01	04	04	04	04	04	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Mate ongerief *	02	02	04	04	03	03	03	01	01	01	01
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel:

1. Doel van de proef.

De prevalentie van vetstapeling in lever en hart neemt toe, wat kan leiden tot diabetes en cardiomyopathie. Obesitas, de consumptie van energierijke voeding en een inactieve leefstijl worden over het algemeen als de onderliggende redenen beschouwt. Recent onderzoek heeft ook aangetoond dat de vroege ontwikkeling (in utero en gedurende spenen) een belangrijke rol speelt. Het is al langer bekend dat obesitas tijdens de zwangerschap zowel korte als lange termijn gevolgen heeft voor moeder en kindⁱ. De nakomelingen van obese moeders hebben namelijk een verhoogd risico op metabole^{ii iii} en cardiovasculaire ziekten^{iv v vi} op latere leeftijd. In recent onderzoek is aangetoond dat dit niet alleen genetische oorzaken heeft maar dat er ook "metabolic programming" plaats vindt, dat wil zeggen dat de omgeving in de vroege ontwikkeling (*in utero*) een belangrijke rol speelt.

In een studie met muizen is aangetoond dat blootstelling aan hoogvet voeding in utero en tijdens de zoogperiode leidt tot vetstapeling in de lever en mitochondriële dysfunctie bij het nageslacht^{vii}. In deze studie zijn echter alleen markers van mitochondriële functie gemeten, terwijl het mogelijk is om met behulp van hoge resolutie respirometrie de mitochondriële functie direct en betrouwbaar te meten. Op deze manier kan er in kaart worden gebracht welke processen in de mitochondrieën niet goed verlopen. Verder is nog onbekend of hepatische mitochondriële dysfunctie de onderliggende reden is voor de toegenomen vetstapeling. Ook is onbekend of soortgelijke processen in het hart plaatsvinden. Het zou kunnen dat vroege blootstelling aan hoogvet voeding ook leidt tot mitochondriële dysfunctie in het hart en op deze manier leidt tot vetstapeling, verminderde hartfunctie en daardoor een verhoogd risico op cardiomyopathie.

Het doel van deze studie is dan ook om de effecten van vroege blootstelling aan hoogvet voeding te onderzoeken in het nageslacht met een focus op ontwikkeling van vetstapeling in hart en lever en de mogelijk lipotoxische gevolgen. We willen daarbij kijken of de mitochondriële functie van de cardiomyocyten en hepatocyten, vetstapeling in het hart en lever bevordert en ook de effecten op systemische glucose tolerantie onderzoeken. De vraag die we willen beantwoorden is: Leidt blootstelling aan hoogvet voeding gedurende de vroege ontwikkeling tot een verhoogde gevoeligheid voor vetstapeling in hart en lever op latere leeftijd? Zijn de gevolgen van de vetstapeling verergerd in deze populatie? Is mitochondriële dysfunctie een onderliggende factor?

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



In de westerse samenleving neemt de incidentie van lever- en hartvervetting sterk toe. Over het algemeen wordt aangenomen dat energierijke, hoogvet voeding en weinig beweging hieraan ten grondslag liggen. Recent onderzoek suggereert dat de vroege blootstelling aan voeding met een hoog vetgehalte bijzonder schadelijk is en de latere reactie op voeding met hoog vetgehalte in belangrijke mate kan bepalen. Een typisch westerse voeding is relatief hoog in vetgehalte en wordt ook door vrouwen op vruchtbare leeftijd geconsumeerd. Mogelijk heeft niet alleen het postnatale voedingspatroon invloed op de ontwikkeling van obesitas en gerelateerde ziekten, maar ook de voeding in utero en gedurende de zoogperiode. In deze studie willen we onderzoeken wat het effect is van hoog vet voeding op de ontwikkeling van vetstapeling in hart en lever en de mogelijk lipotoxische gevolgen bij de nakomelingen. Een beter inzicht in het fysiologische mechanisme dat leidt tot het ontstaan van hartfalen bij vroege blootstelling aan voeding met een hoog vetgehalte kan een beter inzicht geven in de prognose, preventie en therapie.

3. Alternatieven

Er bestaat geen mogelijkheid om in vitro onderzoek te doen naar de effecten van maternale obesitas op de hart- en leverfunctie in het nageslacht, omdat:

1. Het van belang is dat we invloed kunnen uitoefenen op de voeding van de moeder tijdens de draagtijd.
2. We voor het bepalen van de hart- en leverfunctie de gehele organische structuur nodig hebben.
3. Het niet mogelijk is vetzucht te induceren in de geweepte hartspeer- of levercellen.
4. We eveneens willen kijken naar de systemische insulinegevoeligheid.

We achten het gebruik van ongewervelde dieren geen optie, omdat:

1. De bouw van ongewervelde dieren te veel verschilt van de bouw van de mens.

We achten het niet mogelijk dit onderzoek uit te voeren in de mens, omdat:

1. Het nemen van hartspierbiopten en leverbiopten noodzakelijk is om de mitochondriële functie te kunnen bepalen. Gezien de vermoedelijke consequenties is het onethisch om zwangere vrouwen aan een hoog-vet voeding bloot te stellen.

Om deze redenen willen wij dit onderzoek uitvoeren in muizen.

4. Ethische afweging

Muismodellen leveren belangrijk inzicht in de systemische gevolgen van vroege blootstelling aan hoogvet voeding op de gezondheid(srischio's). De mechanismen die van invloed zijn op de ontwikkeling van hartfalen en leververvetting in nageslacht dat al in utero hoogvet voeding heeft gehad, kunnen leiden tot de verbetering van prognose, preventie en therapie.

Het totale ongerief van de dieren wordt ingeschaald op matig tot ernstig, door het toedienen van de anesthesie. Omdat het belang van de proef groot is achten wij deze proef wel ethisch verantwoord.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De prevalentie van type 2 diabetes mellitus (T2DM) en hart- en vaat ziekten neemt sterk toe. Een sterke risicofactor voor deze ziekten is een verhoogd triglyceride (TG) depositie in niet-vetweefsel, zoals hart, lever, alveesklier en de skeletspieren. Ophoping van vet in de niet-adipocyten kan leiden tot insuline resistentie, cellulaire dysfunctie of celdood in de betrokken organen ("lipotoxische" effecten genoemd)^{viii}. In de lever kan vetstapeling (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)) zich verder ontwikkelen door de inflammatoire fase tot Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH).

Er zijn aanwijzingen in muizen dat maternale hoogvet voeding tijdens de zwangerschap de mitochondriële functie in de lever van het nageslacht kan verminderen terwijl het ook vetstapeling bij het nageslacht bevordert. Mogelijk is mitochondriële dysfunctie de onderliggende reden dat de dieren gevoeliger worden voor hepatische vetstapeling^x.

Het is nog onbekend of hoogvet voeding tijdens de zwangerschap ook leidt tot mitochondriële dysfunctie in het hart. Wanneer vroege blootstelling aan hoogvet voeding leidt tot mitochondriële dysfunctie in het hart, zou dat ook kunnen leiden tot vetstapeling, verminderde hartfunctie en daardoor een verhoogd risico op cardiomyopathie^x.

Om te bepalen welke mitochondriële processen door vroege blootstelling aan hoogvet voeding worden verstoord in de lever en in het hart en wat de gevolgen daarvan zijn met betrekking tot vetstapeling, insuline resistentie en cardiale functie, willen we de volgende parameters onderzoeken:

De in vivo cardiale functie zal m.b.v. MRI non-invasief bepaald worden. Hierbij zal zowel de diastolische functie bepaald worden als de systolische functie. De diastolische functie zullen we bepalen door de E/A ratio te meten en de systolische functie zullen we bepalen door de ejectiefraction te meten. Normaalwaarden voor de E/A ratio zijn groter dan 1 en voor de ejectiefraction tussen 55 en 70 %. De ejectiefraction en E/A ratio zijn beiden zeer betrouwbare parameters voor cardiale functie.

Het lipiden spectrum kan niet-invasief worden gemeten met behulp van ¹H-MR spectroscopie in het septum van het hart. Hierdoor krijgen we een overzicht van de verandering van het intracardiale vetgehalte.

Door toediening van ¹³C-gelabelde vetzuren kan de vetopslag in de lever na een maaltijd worden onderzocht. Met behulp van ¹³C/¹H MR spectroscopie kan het vetsignaal afkomstig van ¹³C gelabelde vetzuren uit de voeding in de lever niet-invasief worden gemeten. Aangenomen wordt dat bij een verminderde mitochondriële functie in de lever, de vetopslag na een maaltijd is verhoogd.

De cardiale energiestatus kan niet-invasief bepaald worden met behulp van ³¹P-MRS door te kijken naar de ATP/PCr ratio. De verhouding tussen deze twee verschillende energie producten is eveneens een maat voor de mitochondriële functie.

De metingen met MRS/MRI zouden ook als non-invasieve methoden in de mens gebruikt kunnen worden, ter opsporing van lipotoxische biomarkers.

Ex vivo mitochondriële functie wordt bepaald door mitochondria uit weefsels te isoleren en naar de oxidatieve capaciteit te kijken. Men meet dan het zuurstofgebruik na toevoeging van specifieke substraten in een specifiek milieu. Dit wordt ook wel oxygraaf meting genoemd.

Glucose tolerantie zal bepaald worden door middel van een intraperitoneale glucose tolerantie test. Na zes uur vasten zal 2 mg/kg lichaamsgewicht glucose intraperitoneaal worden toegediend, waarna er op tijdstip 0 (voor intraperitoneale toediening van glucose), 15, 30, 60 en 120 minuten (na toediening van ip glucose) saphaneous bloed worden afgenomen. Na deze bloedafname zal de muis een subcutane injectie krijgen met fysiologisch zout om te compenseren voor de hoeveelheid afgenomen bloed (200µL).

Overige histologische en biochemische analyses van de uitgenomen weefsels zullen worden uitgevoerd ter verdere metabole karakterisering van de muizen in kwestie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project valt onder het

honorering van deze subsidie is dit project beoordeeld op haar wetenschappelijke merites, hetgeen aanleiding is geweest het project te honoreren.

Dit DEC-protocol is dan ook beoordeeld en goedgekeurd door de

De principal investigators van het project in Maastricht zijn

De principal investigator van het project in Nijmegen is

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In deze studie willen we C57BL/6 muizen gebruiken (Charles River). In deze muizen zijn namelijk al eerder soortgelijke experimenten gedaan met succes. We willen een groep vrouwtjes muizen op hoogvet voeding zetten en de andere vrouwtjes op standaard voeding houden. Een groep mannetjes muizen zal eveneens hoogvet voeding krijgen, omdat recent onderzoek heeft aangetoond dat mogelijk ook het voedingspatroon van de vader van invloed is op het ontstaan van vetstapeling bij het nageslacht^{xi}. De andere mannetjesmuizen zullen standaard voeding houden. Na 6 weken op hoogvet of standaard voeding, wanneer alle mannetjes- en vrouwtjesmuizen tien weken oud zijn, willen we de muizen zwanger laten worden. Het mannelijke nageslacht van beide moeders krijgt hoogvet voeding. Omdat niet alle nakomelingen in utero en gedurende spenen zijn blootgesteld aan hoogvet voeding via de moeder, is het mogelijk om te onderzoeken of de nakomelingen die al vroeg zijn blootgesteld aan hoogvet voeding (in utero en gedurende spenen) op latere leeftijd gevoeliger zijn voor de gevolgen van hoogvet voeding dan nakomelingen die later zijn blootgesteld aan hoogvet voeding. De metingen zullen plaatsvinden in de mannelijke nakomelingen. Alle muizen zullen aan het einde van de experimenten via decapitatie.

7b. Sexe

Vetstapeling en mobilisatie van vetten uit ectopisch gestapeld vet bevat geslacht afhankelijke componenten die deels hormonaal geïnduceerd zijn. Om deze reden willen wij ons onderzoek beperken tot het mannelijke geslacht.

7.c. Aantallen

Om de vereiste groepsgroottes te bepalen, werden powerberekeningen uitgevoerd.

Offspring:

Groep 1a en 1b: Mitochondriële functie in lever en hart

Gebaseerd op de gemeten variatie in respirometrie analyses in geïsoleerde mitochondriën van de skeletspier in de muis uit vorige experimenten ($\sigma = 56 \text{ nmol O}_2/\text{mg}/\text{min}$) en een verwachte verschil van $70 \text{ nmol O}_2/\text{mg}/\text{min}$ in maximale zuurstofopname flux, schatten we dat ($\alpha = 0,05$) 11 dieren per groep nodig zijn om een power van 80% te bereiken.

$$n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (56/70)^2 = 10,05 \rightarrow n = 11 \quad (\text{Drop-out is } 0\%)$$

Groep 2a en 2b: IPGTT, hartfunctie, hartvetgehalte, levervetgehalte, visceral fat

Gebaseerd op resultaten uit een recent gepubliceerde studie^{xii} verwachten we bij de IPGTT een standaarddeviatie van $460 \text{ mmol/l} * 120 \text{ min}$ en een verschil van $600 \text{ mmol/l} * 120 \text{ min}$ tussen de verschillende groepen. Gebaseerd op deze waarden schatten we dat er 10 dieren per groep nodig zijn. Dit hebben we berekend met onderstaande powerberekening.

$$n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (460/600)^2 = 9,2 \rightarrow n = 10 \quad (\text{Drop-out is } 0\%)$$

We verwachten geen uitval bij de GTT, omdat het een gestandaardiseerd experiment is waarmee veel ervaring is binnen onze groep.

Gebaseerd op resultaten uit een gepubliceerde studie^{xiii} waarbij cardiale hypertrofie werd gemeten door onder andere te kijken naar het gewicht van de linkerventrikel, verwachten we een standaarddeviatie van $0,5 \text{ g}/\text{m}^2$ en een verschil van $0,6 \text{ g}/\text{m}^2$. Gebaseerd op deze waarden schatten we dat er 11 dieren nodig zijn, zoals berekend met onderstaande formule.

$$n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (0,5/0,6)^2 = 10,97 \rightarrow n = 11 \quad (\text{Drop out is } 10\%)$$

Om het aantal dieren in de proef te verminderen, willen we deze groep dieren drie maal meten. Dit betekent dat de dieren twee maal wakker zullen worden uit narcose na het MR experiment waarin hartfunctie, hartvetgehalte, levervetgehalte en visceraal vet worden gemeten. Aangezien dit extra stress met zich mee zal brengen, verwachten we dat de uitval in deze groep dan ook groter zal zijn. We schatten de uitval in op 10%. In dit geval hebben we dus $11 * 1,1 = 13$ muizen nodig in deze groep.

Groep 3a en 3b (Nijmegen): Vetopslag in de lever na maaltijd

Voor deze meting zijn er weinig gegevens bekend. Er kan worden uitgegaan van data verkregen in homozygote en heterozygote ZDF ratten voor ^{13}C vetsignaaltoename in de lever 4 uur na een maaltijd ($\sigma = 0.011$, $\delta = 0.03$)^{xiv}, waarbij het verschil tussen de muizengroepen in dit experiment kleiner zal zijn. Als we uitgaan van de helft van het verschil tussen de ratten groepen, kan de volgende groepsgrootte worden berekend:

$$n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (0.011/0.015)^2 = 8,4 \rightarrow n = 9$$

Groep 4: Optimalisatie MRI/MRS

Voor optimalisatie van het MRI/MRS experiment wordt een extra groep van 8 gezonde muizen aangevraagd (voor het opzetten en optimaliseren van de ^{31}P -MRS metingen in hart en lever). Deze worden na de scan onder anesthesie door middel van decapitatie opgeofferd.

Fok:

We weten dat C57BL/6 muizen geen geweldige fokkers zijn. In het eerste nest verwachten we 3 a 4 pups. Per 2 vrouwtjes kunnen we een manntjes muis inzetten en deze kan na 7 dagen rust op nieuw ingezet worden bij twee andere vrouwtjes. Omdat we onderzoek willen doen bij nageslacht van muizen die voor en tijdens de zwangerschap hoogvet voeding of standaard voeding hebben genoten, willen we eerst 22 van de 44 vrouwtjes muizen op de leeftijd van 4 weken op een hoogvet dieet zetten. Als deze vrouwtjes muizen 10 weken oud zijn, willen we ze inzetten voor de fok. Voor de fok willen we 12 mannetjes muizen gebruiken, waarvan 6 mannetjesmuizen ook hoogvet voeding hebben gehad en 6 mannetjesmuizen standaard voeding hebben gehad. Deze mannetjes muizen kunnen ingezet worden bij 2 vrouwtjes muizen en na zeven dagen nog eens bij 2 vrouwtjes muizen.

Groep 5a

22 vrouwtjesmuizen die op de leeftijd van 4 weken hoogvet voeding krijgen en op de leeftijd van 10 weken worden ingezet voor de fok.

Groep 5b

22 vrouwtjes muizen die na 10 weken standaard chow voeding worden ingezet voor de fok.

Groep 6a

6 mannetjes muizen die op een leeftijd van 4 weken hoogvet voeding krijgen en op de leeftijd van 10 weken worden ingezet voor de fok.

Groep 6b

6 mannetjes muizen die na 10 weken standaard chow voeding worden ingezet voor de fok.

Totaal

Groep 1a+1b: 22 dieren (mannelijk nageslacht)

Groep 2a+2b: 26 dieren (mannelijk nageslacht)

Groep 3a en 3b: 18 dieren (mannelijk nageslacht)

Groep 4: 8 dieren (vrouwelijk nageslacht)

Groep 5a+5b: 44 dieren (moederdieren)

Groep 6a + 6b: 12 dieren (vaderdieren)

Totaal aantal dieren: 130 dieren

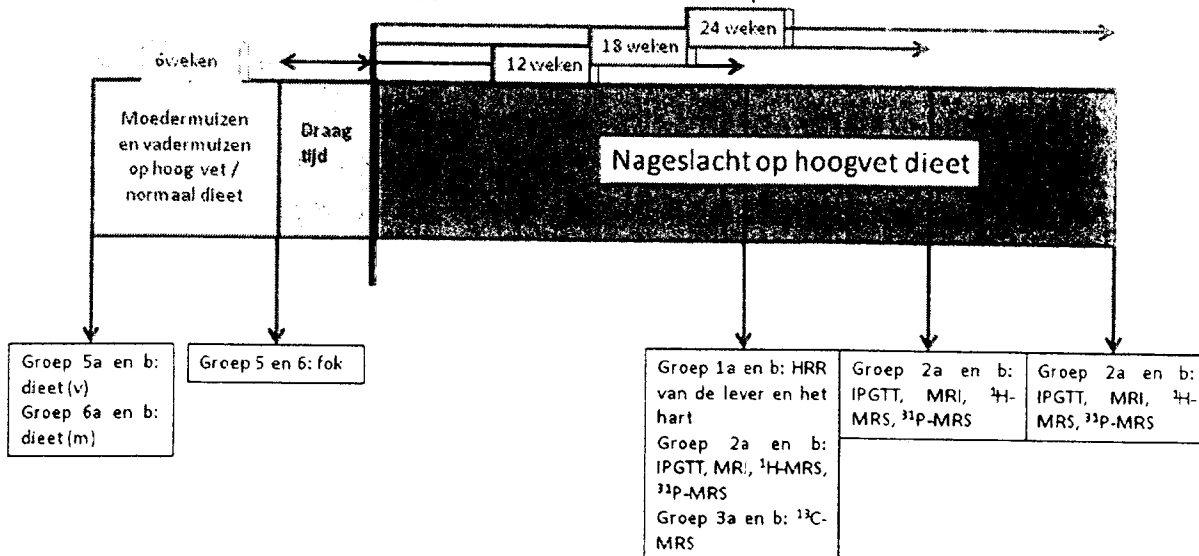
6 Dierproef

8. Experiment

Omdat we onderzoek willen doen naar de effecten van vroege blootstelling aan hoogvet voeding bij nageslacht van hoogvet gevoerde moeder muizen en nageslacht van standaard gevoerde moedermuizen, willen de helft van de vrouwtjes muizen (22 van de 44 muizen) die we gaan inzetten voor de fok op de leeftijd van 4 weken op hoogvet voeding zetten. Als de vrouwtjes muizen 10 weken oud zijn, willen we ze inzetten in de fok. Voor de fok willen we 12 mannetjes muizen gebruiken, waarvan 6 mannetjesmuizen eveneens 6 weken lang hoogvet voeding hebben gehad en 6 manntjesmuizen altijd normaal chow voeding hebben gehad. Deze mannetjes muizen kunnen ingezet worden bij 2 vrouwtjes muizen en na zeven dagen nog eens bij 2 vrouwtjes muizen. We willen de mannetjes muizen bij de twee verschillende vrouwtjesgroepen inzetten.

Fok:

Om 64 mannetjes pups te verkrijgen zullen 44 vrouwtjes muizen en 12 mannetjes muizen worden gebruikt voor fokdoeleinden. De vrouwtjes muizen zullen na de zoogperiode worden opgeofferd door middel van decapitatie. De mannetjes zullen daarna ook worden opgeofferd door middel van decapitatie.



Het nageslacht van beide groepen vrouwtjes muizen willen we op hoogvet voeding zetten, nadat ze gespeend zijn. Om te onderzoeken of muizen die vroeg aan hoogvet voeding werden blootgesteld eerder vet stapelen en lipotoxiciteit ontwikkelen, dan muizen die pas later aan hoogvet voeding werden blootgesteld, willen we op de verschillende tijdstippen meten wat is weergegeven in onderstaande tabel.

Experimentele procedure:

Group	Experiment	Group	Experiment	Group	Experiment
1a en 1b (total 22 mice)	HRR van de lever en het hart				
2a en 2b (total 26 mice)	IPGTT, MRI, ¹ H-MRS, ³¹ P-MRS	2a en 2b	IPGTT, MRI, ¹ H-MRS, ³¹ P-MRS	2a en 2b	IPGTT, MRI, ¹ H-MRS, ³¹ P-MRS

3a en 3b ¹³C/¹H-MRS
(total 18 mice)

MRI van hart en lever:

Van deze groepen zullen er dieren op een leeftijd van 12, 18 en 24 weken een MRI scan van het hart ondergaan waarbij naar de cardiale functie, naar het lipidspectrum en de ATP/PCR ratio in hart en lever gekeken wordt. MRI / MRS metingen vinden plaats onder anesthesie met Isofluraan 2-5%. Na de scan op 24 weken zullen de dieren worden opgeofferd, door middel van decapitatie. Het bloed zal voor chemisch onderzoek gebruikt worden.

Levervetmetabolisme (deze meting vindt plaats in Nijmegen):

De muizen worden op een leeftijd van maximaal 6 weken naar Nijmegen getransporteerd en worden daar verder op het juiste dieet gezet.

Op de leeftijd van 12 weken zullen de dieren een baseline meting ondergaan om het ¹³C vetsignaal in de lever voor de toediening van gelabelde vetzuren te bepalen (natuurlijk voorkomen van ¹³C). Twee dagen later worden er in gevaste toestand gelabelde vetzuren toegediend en na 4h, 6h en 8h zal de hoeveelheid gelabelde vetzuren in de lever opnieuw worden bepaald. Bij de baseline meting worden de muizen onder anesthesie gebracht met behulp van isofluorane en ondergaan een MRI scan van de lever, waarbij de hoeveelheid ¹³C gelabelde vetzuren wordt bepaald met behulp van ¹H/¹³C MRS. Deze scan duurt maximaal 2 uur. Nadat de dieren hersteld zijn van de narcose (2 dagen later) worden de dieren 4 uur na een orale gavage van vetzuren weer onder anesthesie gebracht met behulp van isofluorane, en wordt het ¹³C vetsignaal opnieuw gemeten, evenals twee uur later en 4 uur later. De muizen blijven hierbij onder narcose (maximaal 6 uur) en worden onder narcose gedecapiteerd.

De Oxygraaf-metingen van hart en lever:

Dieren worden op een leeftijd van 12 weken opgeofferd middels sedatie met CO₂ en O₂ (2:1 ofwel 67% vs 33%), waarna decapitatie wordt uitgevoerd. Voor mitochondriële functie metingen is het van groot belang dat de organen van interesse binnen seconden na overlijden uit het lichaam worden verwijderd. Na opoffering wordt de hartspeer of de lever verwijderd en worden deze twee weefsels verder voorbereid voor ex vivo mitochondriële functie analyses. Het resterende materiaal wordt gebruikt voor histologisch en chemisch onderzoek, om o.a. de verschillende lipiden metabolieten en andere metabole markers te bepalen. Verder zullen deze muizen 2 dagen voor opoffering, gedurende 48 uur gehuisvest worden in metabole kooien, zodat urine en feces verzameld kan worden en de food-intake geregistreerd kan worden. Aan de hand van deze gegevens in combinatie met chemische analyses zou een metabool profiel opgesteld kunnen worden.

IPGTT

De muizen zullen op 3 tijdstippen, één week voor de MRI/ MRS metingen, een glucose tolerantie test ondergaan, zodat we een beeld krijgen van het effect van vetstapeling in deze dieren op de glucose tolerantie.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Muizen zullen gedecapiteerd worden onder sedatie met CO₂ en O₂ (67:33%) voor de experimenten waarbij we mitochondriële functie zullen bepalen. Voor de MRI experimenten wordt anesthesie geïnduceerd middels 5% isofluraan in O₂ en onderhouden middels 1.5-2.5% isofluraan in O₂. Aan het einde van de MRI / MRS experimenten worden de muizen direct opgeofferd middels decapitatie.

9b. Pijnbestrijding

De muizen zullen geen pijnbestrijding ontvangen tijdens de glucose tolerantie test, omdat bekend is dat analgetica interfereren met het glucose metabolisme^{xv}.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie vindt plaats middels decapitatie. Normaal gesproken zullen de dieren zonder vroegtijdige euthanasie worden gedood. Mochten er toch onverwachte ernstige complicaties optreden, dan zal in overleg met de betrokken onderzoekers en de artikel 14 WOD functionaris worden besloten of het dier uit de proef genomen moet worden.

De dieren zullen voortijdig geëuthanaseerd worden bij:

Gegeneraliseerde afname in zelfverzorging en abnormale verschijning over een periode van meer dan 2 dagen (met name ruwe haarvacht, afwijkende ademhaling en ernstige gewichtsafname >10%).

10a. Ongerief



Totaal ongerief per groep:
groep 1a en 1b: matig (03)

- a. Voorbereiding op de experimenten (1 keer): gering (01)
- b. Huisvesting in metabole kooien op de leeftijd van 12 weken (gedurende 48 uur): matig (03)
- c. Wijze van euthanasie: decapitatie: gering (01) (gebaseerd op 2009-037)
- d. Toestand aan het einde van het experiment: dood

groep 2a en 2b: matig/ernstig (04), omdat de verschillende onderzoeken meerdere keren plaatsvinden

- a. Glucose Tolerantie Test op de leeftijd van 11, 17 en 23 weken (gedurende 2 uur): matig (03)
- b. Uitvoeren van MR experiment onder anesthesie op de leeftijd van 12, 18 en 24 weken (gedurende 3 tot maximaal 4 uur): matig (03) (gebaseerd op 2003-019, 2006-141, 2009-092)
- c. Wijze van euthanasie: decapitatie: gering (01) (gebaseerd op 2009-037)
- d. Toestand aan het einde van het experiment: dood

groep 3a en 3b: matig (03)

- a. Uitvoeren van MR experiment onder anesthesie op de leeftijd van 12 weken (gedurende maximaal 2 uur): matig (03) (gebaseerd op 2003-019, 2006-141, 2009-092)
- b. Twee dagen later - Uitvoeren van terminaal MR experiment onder anesthesie op de leeftijd van 12 weken (maximaal 6 uur): matig (03)
- c. Wijze van euthanasie: decapitatie: gering (01) (gebaseerd op 2009-037)
- d. Toestand aan het einde van het experiment: dood

Groep 4: matig (03)

- a. Uitvoeren van MR experiment onder anesthesie op een leeftijd vanaf 8 weken (gedurende maximaal 3 uur): matig (03) (gebaseerd op 2003-019, 2006-141, 2009-092)
- b. Wijze van euthanasie: decapitatie: gering (01) (gebaseerd op 2009-037)
- c. Toestand aan het einde van het experiment: dood

Groep 5a en 5b: gering (01)

- a. De vrouwtjesmuizen zullen gedurende 12 uur worden ingezet voor fokdoeleinden. De vrouwelijke muizen zullen maximaal 5 dagen achter elkaar worden ingezet voor de fok, wanneer blijkt dat er niet direct een plug aanwezig is na de eerste keer dat ze ingezet zijn. Het ongerief wordt ingeschat op gering (01).
- b. Plugcontrole na 12 uur in aanwezigheid van een mannetjemuis. Het ongerief wordt ingeschat op gering (01).
- c. Wijze van euthanasie: cervicale dislocatie: gering (01) (gebaseerd op 2009-037)
- d. Toestand aan het einde van het experiment: dood

Groep 6a en 6b: gering (01)

- a. De mannetjesmuizen zullen gedurende 12 uur worden ingezet voor fokdoeleinden. De mannetjesmuizen worden ingezet bij 2 vrouwtjesmuizen en na 7 dagen nog eens bij twee vrouwtjesmuizen. Het ingerief wordt ingeschat op gering (01).
- b. Wijze van euthanasie: cervicale dislocatie: gering (01) (gebaseerd op 2009-037)
- c. Toestand aan het einde van het experiment: dood

De aarde, ernst, duur en frequentie van de handelingen per groep zijn weergegeven in onderstaande tabel:

Groep	Aard	Ernst	Duur	Frequentie
1a en 1b	Vorbereiding experiment	01	Zo snel mogelijk	1 keer
	Huisvesting in metabole kooien	03	48 uur	1 keer
	Euthanasie d.m.v. Decapitatie	01	Zo snel mogelijk	1 keer
2a en 2b	Intraperitoneale glucose tolerantie test	03	6 uur vasten + 2 uur IPGTT	3 keer
	Uitvoeren MR experiment onder anesthesie	03	3 tot maximaal 4 uur	3 keer
	Euthanasie d.m.v. Decapitatie	01	Zo snel mogelijk	1 keer
3a en 3b	Uitvoeren MR experiment onder anesthesie	03	Maximaal 2 uur	1 keer
	Uitvoeren MR experiment onder anesthesie	03	Maximaal 6 uur	1 keer
	Euthanasie d.m.v. Decapitatie	01	Zo snel mogelijk	1 keer
4	Uitvoeren MR experiment onder anesthesie	03	Maximaal 3 uur	1 keer
	Euthanasie d.m.v. Decapitatie	01	Zo snel mogelijk	1 keer
5a en 5b	Inzet in fok	01	12 uur	Maximaal 5 dagen achter elkaar, totdat ze drachtig zijn
	Plucontrole	01	Zo snel mogelijk	Even vaak als ze ingezet zijn voor de fok
	Euthanasie d.m.v. Cervicale dislocatie	01	Zo snel mogelijk	1 keer
6	Inzet in fok	01	12 uur	2 keer
	Euthanasie d.m.v. Cervicale dislocatie	01	Zo snel mogelijk	1 keer

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere MRI experimenten (CPV, protocol 2009-092) is bekend dat muizen, ook met cardiale problematiek, minstens 3 uur onder anesthesie kunnen blijven in de MRI scanner. We verwachten dat dit voldoende is om de experimenten uit te kunnen voeren.

Het welzijn van de muis zal tijdens de MRI experimenten voortdurend gecontroleerd worden middels monitoring van de rectaal temperatuur, het meten van een ECG en ademhalingsmonitoring.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden tijdens het onderzoek gehuisvest in de standaard faciliteiten van het CPV. De dagelijkse verzorging vindt plaats door personeel van het CPV. De muizen kunnen in groepen gehuisvest worden behalve die dieren die op een leeftijd van 12 weken voor de oxygraaf metingen opgeofferd worden (groep 1a, 1b), omdat bij

deze dieren urine en ontlasting dient opgevangen te worden. Deze dieren worden 48 uur voor opoffering gehuisvest in metabole kooien. Daarnaast wordt bij deze groep de voedselinname (wel ad libitum) geregistreerd. Alle andere dieren krijgen eveneens ad libitum voedsel verstrekking.

Dieren uit groep 3a en 3b zullen op een leeftijd van 6 weken getransporteerd worden naar Nijmegen.

MRI onderzoek in Maastricht vindt plaats op de 7 Tesla dierexperimentele MR scanner, welke is gesitueerd op

MRI onderzoek in Nijmegen vindt plaats op de 9.2 Tesla dierexperimentele MR scanner.

De VVO dient gewaarschuwd te worden bij calamiteiten.

12. Deskundigheid

Betrokkenen zijn allen bevoegd volgens artikel 9 en 12 en hebben ruimschoots ervaring met dergelijke proeven of zullen daar gedurende het experiment verder voor worden opgeleid.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

1. Glucose Tolerantie test
2. MRI / MRS experiment op muizen met gebruik van gas anesthesie
3. Opoffering van de dieren voor het bepalen van mitochondriële functie en verdere weefselisolatie

Relevante literatuur

Eventueel een kopie bijvoegen.

ⁱ Catalano P.M. and Ehrenberg H.M., (2006) The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring, *BJOG* 113: 1126-1133

ⁱⁱ Catalano P.M., (2003) Obesity and pregnancy - The propagation of a viscous cycle?, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:3505-3506

ⁱⁱⁱ Catalano P.M., Presley L., Minium J., Haguel-de Mouzon S., (2009) Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero, *Diabetes Care* 32: 1076-1080

^{iv} Barker D.J.P., Osmond C., Winter P.D., Margetts B., Simmonds S.J., (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease, *The Lancet* 576-580

^v Armitage J.A., Taylor P.D. and Boston L., (2005) Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development, *The Journal of Physiology* 565.1: 3-8

^{vi} Mills J.L., Troendle J., Conley M.R., Carter T. and Druschel C.M., (2010) Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study, *The American Journal of Clinical Nutrition* 91:1543-1549

^{vii} Bruce K.D., Cagampang F.R., Argenton M., Zhang J., Ethirajan P.L., Burdge G.C., Bateman A.C., Clough G.F., Poston L., Hanson M.A., McConnell J.M. and Byrne C.D., (2009) Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression, *Hepatology* 50: 1796-1808

^{viii} Ouwers D.M. and Diamant M., (2007) Myocardial insulin action and the contribution of insulin resistance to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy, *Arch Physiol Biochem* 113:76-86

^{ix} Bruce K.D., Cagampang F.R., Argenton M., Zhang J., Ethirajan P.L., Burdge G.C., Bateman A.C., Clough G.F., Poston L., Hanson M.A., McConnell J.M. and Byrne C.D., (2009) Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression, *Hepatology* 50: 1796-1808

^x Chiu H-C, Kovacs A., Ford D.A., Hsu F-F, Garcia R., Herrero P., Saffitz J.E. and Schaffer J.E., (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy, *J. Clin. Invest.* 107:813-822

^{xi} Ng S-F, Lin R.C.Y., Laybutt D.R., Barres R., Owens J.A. and Morris M.J., (2010) Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring, *Nature* 467:963-967

^{xii} Andrikopoulos S., Blair A. I., Deluca N., Fam B.C. and Proietto J., (2008) Evaluating the glucose tolerance test in mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1323-E1332

^{xiii} Tikellis C., Thomas M.C., Harcourt B.E., Coughlan M.T., Pete J., Bialkowski K., Tan A., Bierhaus A., Cooper M.E. and Forbes J.M., (2008) Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:323-330

^{xiv} Jonkers et al, Abstract during third annual meeting of the ISMRM Benelux Chapter, 2011

^{xv} Rodrigues S.F., de Oliveira M.A., Martins J.O., et al. (2006) Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route, *Life Sci* 79: 1630-1637

1. Glucose Tolerance Test Protocol (GTT)

Discomfort code 03

Reagents:

Glucose (dextrose solution)

2% EDTA

Sterile saline

Equipment:

Restrain device

Gauze and alcohol swabs

Timer

Razor or scalpel

Syringe (1mL)

Needles (25G)

Bucket and ice

Heparinized micro-pipette (Fisher 21170L)

Blood Collecting Tube (Fisher 054077)

Centrifuge

Gel-loading tips

Eppendorf tubes (for storage)

Method:

Met behulp van de intraperitoneale (ip) GTT word de insuline gevoeligheid getest. De IPGTT zullen op 3 tijdpunten in de studie worden uitgevoerd (T = 11, 17 en 23 weken).

Voor de IPGTT worden de muizen eerst 6 uur nuchter gezet.

Vervolgens krijgen de muizen een glucose bolus (2 mg/kg lichaamsgewicht) toegediend middels een ip-injectie.

0, 15, 30, 60 en 120 minuten na de ip-injectie zullen bloedmonsters worden afgenomen via de vena saphaneous. Hierbij worden de muizen in een koker geplaatst met de achterpoten vrij. De vacht van de achterpoten wordt afgeschoren en vervolgens wordt de vena saphanous aangeprikt met een 25G naald. Bloed monsters (40 ul) worden opgevangen in een heparine cuvette.

Na de laatste bloedafname zal via een subcutane injectie met saline (200 ul) het bloedvolume weer worden aangevuld.

2. MRI/MRS experiment op muizen met gebruik van gas anesthesie

Ongerief code 03

1. Inleiding

Deze SOP omvat alle procedures die op de 7 Tesla dierscanner in

worden uitgevoerd op muizen. Deze SOP gaat expliciet over experimenten waarbij de muis NIET bij komt uit anesthesie en beschrijft de handelingen die voor een standaard MR experiment van belang zijn. Eventuele afwijkingen of aanvullingen op dit protocol dienen te worden vermeld in DEC aanvraag en bijhorend werkprotocol.

2. Middelen

MR magneet (7T)

Isofluraan verdamper

Anesthesiegassen: lucht / zuurstof / isofluraan, regelbaar middels flowmeters
Afzuiging gassen

Dierbed met bevestiging voor de MR spoel
Verwarmingmatje (middels waterbad)
Anesthesie kapje (op maat gemaakt voor specifieke meting)
Endorectale temperatuur sensor (Luxtron)
Bewegingssensor t.b.v. ademhalingsmonitoring
ECG leads t.b.v. hartslagmonitoring

Weegschaal

3. Procedure

Alle handelingen worden uitgevoerd door experimentator (bekwaam art. 9 of 12)

- Het waterbad / warmtematje worden voor aanvang van het experiment alvast op temperatuur (+/- 40°C) gebracht en de anesthesie gassen worden in de juiste verhouding ingesteld.
- De conditie van de muis wordt voorafgaand aan het experiment beoordeeld (beweeglijk, nieuwsgierig, normaal gedrag, geen wonden). Bevindingen worden geregistreerd.
- De muis wordt gewogen. Gewicht wordt geregistreerd.
- De muis wordt onder anesthesie gebracht in inductiebox met een 3-4% Isofluraan bevattend gasmengsel. De experimentator observeert of de muis goed ingeleid wordt aan het gedrag van de muis. Na mogelijk eerst wat spasmen, verdwijnt de spierspanning, wordt de ademhaling zichtbaar langzamer en er zijn geen reacties meer op aanraken en/of pijnprikkels.
- De gastoevoer wordt overgezet naar het dierbed en het Isofluraan percentage kan naar 1-2%.
- De muis wordt in het dierbed gepositioneerd.
- De endorectale temperatuur sensor wordt ingebracht, de ademhalingssensor wordt gepositioneerd en de ECG leads worden aangesloten op de rechtervoorpoot en de linkerachterpoot.
- Na controleren van de conditie van de muis wordt de opstelling de MRI scanner ingeschoven en kan de MR meting gestart worden.
- Tijdens de duur van het experiment worden ademhaling, hartslag en temperatuur van de muis regelmatig gecontroleerd (elke 10 minuten). Isofluraan percentages en de temperatuur van het warmwatermatje worden aangepast om de temperatuur (37-39 graden Celcius) en diepte van anesthesie (40-100 ademhalingen per minuut) zo stabiel mogelijk te houden.
- Na voltooiing van de MR metingen wordt de opstelling uit de scanner gehaald. Na het verwijderen van de rectale temperatuursensor en de ECG leads kan de Isofluraan verdamper uitgedraaid worden.
- De muis wordt, indien het een terminaal experiment betreft, nog voor het bijkomen gedecapiteerd om zo het ongerief zo veel mogelijk te verzachten.
- Indien het geen terminaal experiment betreft, wordt het welzijn van de muis gemonitord tijdens het bijkomen uit anesthesie.

NB: Alhoewel de 7T dierexperimentele MRI scanner is gelokaliseerd is, zullen de dieren niet
in de scanner worden geplaatst. De dieren zullen

3. Opoffering van dieren voor weefsel isolatie

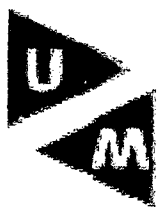
Ongerief code 01

Benodigdheden:

- CO₂/O₂ box

Procedure:

- De dieren worden voor de isolatie van de organen voor testen van de mitochondriële functie, ROS productie en metabolieten na een sedatie met CO₂ en O₂ (2:1 of 67% vs. 33%) in de CO₂/O₂ box worden opgeofferd via decapitatie.
- Vervolgens zullen alle spieren van beide onderbenen en het hart worden uitgenomen
- Ten behoeve van de mitochondriële isolatie zullen de betreffende spieren of het hart direct in ijskoude isolatiebuffer geplaatst worden.
- De andere organen worden bevroren in de vloeibare stikstof en bewaard in -80°C vriezer.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

E. voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: (

Uw referentie:

Onze referentie : MQ- 174-11

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: '

..... ', is op de DEC vergadering van
25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC vraagt zich af waarom alle vaders op een hoogvet dieet gezet worden als bekend is (vermoed wordt), dat het voedingspatroon van de vader een rol speelt bij vetstapeling bij nakomelingen?
- Waarom wordt er niet gestreefd naar vermindering van genetische variatie (bij vaders en moeders), als bekend is dat erfelijke aanleg een rol speelt (of vergroting genetische homogeniteit bijvoorbeeld door transgene constructen).
- Waarom krijgen ♂♂ nakomelingen na het spenen vetrijk voedsel? Hoe kun je dan onderscheid maken tussen 'in vitro' en postnatale beïnvloeding, als er geen metingen in de zoogtijd worden uitgevoerd.
- De DEC vraagt zich af of het mogelijk is om de dieren al eerder op dieet te zetten zodat ze eerder ingezet kunnen worden in de fok. Als de dieren pas op 12 weken voor het eerst in fok worden gezet, kunnen mogelijk problemen met de fok worden verwacht.
- Bij punt 6 verzoekt de DEC aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd.
- De DEC merkt op dat er verkeerd is afgerond bij groep 1a en 1b en verzoekt dit aan te passen.
- Bij punt 10a mist de DEC de vermelding van het ongerief van de groepen 5 en 6. De DEC verzoekt in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven en dit moet in overeenstemming zijn met het voorblad (groep 2a en 2b is wellicht code 04).

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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 2011-053, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Maastricht, 06-04-2011

Geachte c

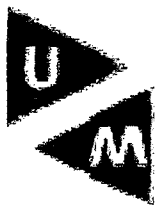
Hartelijk dank voor uw waardevolle opmerking naar aanleiding van mijn projectaanvraag:

besproken is op de DEC vergadering van 25 maart 2011. , welke

Ik wil graag per punt ingaan op de vragen/opmerkingen van de DEC.

- De duur van de proef is aangepast op het voorblad.
- Dit is een misverstand en het was inderdaad niet duidelijk vermeld. De vaders van de nakomelingen die al in utero aan hoogvet voeding worden blootgesteld, worden ook op hoogvet voeding gezet. De vaders van de dieren die niet in utero worden blootgesteld aan hoogvet voeding, daarentegen niet. Dus de "blootgestelde" nakomelingen zijn dieren waarvan zowel de vader als de moeder hoogvet voeding hebben gekregen. De "niet-blootgestelde" groep daarentegen omvat dieren waarvan zowel de vader als de moeder chow hebben gekregen. In de tekst was dit niet duidelijk uitgelegd en dat is nu aangepast.
- De keuze van de proefdieren hebben we gebaseerd op een eerdere studie (Bruce et al., Hepatology 50, 2009). In die studie werden bij C57BL6 muizen, in een identiek opgezet experiment, effecten gevonden van vroege blootstelling aan een hoogvet dieet op vetgehalte en ontstekingsmarkers in de lever en markers van mitochondriële functie. Om te onderzoeken of hetzelfde protocol ook effecten heeft op het hart, stellen we voor om dezelfde muizensoort te gebruiken.
- Het is niet het doel van de studie om het verschil tussen prenatale en postnatale blootstelling aan vetrijke voeding te onderzoeken. We willen in eerste instantie onderzoeken of vroege blootstelling aan vetrijke voeding (in utero en gedurende spenen), dieren gevoeliger maakt voor de gevolgen van vetrijke voeding op latere leeftijd. Dit is in de tekst duidelijker geformuleerd.
- Het is inderdaad mogelijk om de dieren al eerder op vetrijke voeding te zetten en dus vroeger in de fok te zetten. We stellen in het aangepaste protocol voor om de dieren op 4 weken op vetrijke voeding te zetten en dus op 10 weken in de fok te zetten.
- Dit is aangepast. Zie daarvoor punt 6.
- De afronding bij groep 1a en 1b is aangepast in het nieuwe protocol.
- Het ongerief van de groepen 5 en 6 is vermeld en het ongerief (aard, ernst, duur en frequentie) van alle groepen is weergegeven in een tabel.

Hoogachtend,



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: 0

Uw referentie:

Onze referentie : MQ- 263-11

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag:

„ is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

- De DEC verzoekt bij punt 6 aan te geven dat “**dit DEC protocol**” wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is door.....

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 **2011-053**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Maastricht, 17-05-2011

Geachte dr. Hoenderken,

In antwoord op uw opmerking naar aanleiding van mijn projectaanvraag:

"...", welke besproken is op de DEC vergadering van 29 april 2011, is in het DEC-protocol aangegeven (en grijs gemarkeerd) wie dit DEC-protocol wetenschappelijk heeft beoordeeld en goedgekeurd.

Hoogachtend,



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
29-05-2011

Project:

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T (043) 7

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-053
Diersoort: muis
Aantal dieren: 130
Einddatum: 25-05-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

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

Vice-Voorzitter DEC-UM