

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-167

Ontvangen: 20-12-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
10-01-2012	Nieuw

VROM/GGONR ³
02-141

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject	3.						
-------------	----	--	--	--	--	--	--

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

Budgetnummer	30983319N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Het effect van nitraat op de zuurstofspanning en de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque

startdatum 01-01-2012

einddatum ⁹ 01-01-2016

Duur van de proef¹⁰: 4 mnd

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

Diergroep	1 Exp 1	2 Exp 1	3 Exp 2	4 Exp 2	5 Exp 3		
ctrl/exp/sham	Ctrl	EXP	ctrl	EXP	exp		
Diersoort	01	01	01	01	01		
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6		
Construct / mutatie ?	LDLRko	LDLRko	LDLRko	LDLRko	WT		
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01		
Aantal	20	20	20	20	56		
Geslacht	M	M	M	M	M/V		
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja		
Leeftijd/gewicht	10-12 wk	10-12 wk	10-12 wk	10-12 wk	10-20 wk		
Doel van de proef *	31	31	31	31	31		
Belang van de proef *	01	01	01	01	01		
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01		
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	02		
Anesthesie *	04	04	04	04	01		
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01		
Mate ongerief *	02	02	02	02	01		
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01		

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Het effect van nitraat op de zuurstofspanning en de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque

1. Doel van de proef.

Het doel van deze proef is onderzoeken of inname van nitraat de lage zuurstofspanning (pO_2) in de atherosclerotische plaque kan verhogen en een functioneel effect heeft op plaque ontwikkeling en de ophoping van dode cellen. In macrofagen in vitro wordt bestudeerd wat het achterliggende mechanisme is.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Hart- en vaatziekten, en de onderliggende oorzaak atherosclerose vormen al sinds vele jaren een zeer belangrijke doodsoorzaak in de Westerse wereld. Met dit onderzoek willen wij een bijdrage leveren aan de nog incomplete wetenschappelijke kennis over atherosclerose en meer in het bijzonder de relatie tussen de lage zuurstofspanning in de plaque en de ontwikkeling van atherosclerose. Als blijkt dat inname van nitraat de lage zuurstofspanning (pO_2) in de atherosclerotische plaque kan verhogen en de ontwikkeling van atherosclerose remt, kan dit mogelijk tot de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor de behandeling van deze ziekte kunnen leiden.

3. Alternatieven

Atherosclerose is een complexe ziekte waarbij veel verschillende cellen en orgaansystemen een rol spelen. Door deze hoge mate van complexiteit is het niet altijd mogelijk om gebruik te maken van alternatieve methodes omdat deze nooit het volledige beeld van interacties kunnen laten zien, zoals deze in de mens spelen. Een mogelijk alternatief voor de werking van nitraat zou celkweek kunnen zijn. Via in vitro studies kan echter alleen op celniveau gekeken worden en niet zoals noodzakelijk op systemisch niveau, waardoor het vrijwel onmogelijk wordt om de resultaten te kunnen extrapoleren naar de menselijke situatie. Om dezelfde reden is het ook niet mogelijk om gebruik te maken van weefselkweek. Wel gebruiken we waar mogelijk in vitro onderzoeken met name voor deelprocessen in atherosclerose zoals apoptose, angiogenese en fagocytose.

4. Ethische afweging

Atherosclerose vormt als oorzaak van acute hart- en vaatziekten een groot probleem voor de samenleving. Patiënten kunnen zeer diverse problemen krijgen en het risico op overlijden is nog altijd groot. De beschikbare behandelingen zijn veelal invasief en bieden niet altijd een langdurig positief resultaat. Daarnaast heeft de ziekte mede hierdoor ook effecten op de sociale omgeving van de patiënt. Het is dus van belang om beter inzicht te krijgen in de ontwikkeling, progressie en eventuele behandeling van atherosclerose. De verwachting is dat dit onderzoek niet alleen kan leiden tot mogelijk verbeterde inzichten in deze pathologie, maar eveneens tot nieuwe behandelingswijzen voor atherosclerose vooral aangezien nitraat vanuit farmacotherapeutisch oogpunt een uiterst aantrekkelijke methode is. Nitraat komt voor in de voeding, zoals in rode bieten en groene bladgroenten. Aangezien atherosclerose een hoge complexiteit heeft, is het noodzakelijk om (een gedeelte van) het onderzoek in vivo uit te voeren. Hierdoor kunnen alle mogelijke systemische invloeden integraal worden meegenomen en wordt de extrapolatie naar de humane situatie verder vergroot.

Als er een afweging gemaakt wordt tussen het maatschappelijk belang van het vinden van voortschrijdende inzichten in atherosclerose en het ongerief van de proefdieren, dan zijn de onderzoekers van mening dat dit onderzoek ethisch gerechtvaardigd is, door de potentiële bijdrage aan de kennis en inzichten over atherosclerose en de perspectieven om te komen tot nieuwe interventies op het gebied van hart- en vaatziekten.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Het doel van deze proef is onderzoeken of inname van nitraat de lage zuurstofspanning (pO_2) in de atherosclerotische plaque kan verhogen en een functioneel effect heeft op plaque ontwikkeling en de ophoping van dode cellen. We hebben recent aangetoond dat de pO_2 in een plaque verlaagd is¹⁻³ en verhoogd kan worden door carbogeen-gas (95% O_2 /5% CO_2) behandeling. Deze behandeling leidde tot plaques met een kleinere necrotische kern, maar had geen effect op de vorming en grootte van de plaque (van Gink&Sluimer ongepubliceerde resultaten). Deze studie laat zien dat manipulatie van plaque PO_2 , effect heeft op de plaque samenstelling. Vanwege het milde effect van carbogeen en de lastige translatie van toediening naar de kliniek, onderzoeken we nu alternatieve methoden, zoals nitraat.

Zuurstof is onmisbaar voor de energieproductie van de cel, m.n. de ATP productie door oxidatieve fosforylering. De inname van nitraat ($NaNO_3$) via drinkwater leidt tot een afname van het zuurstofgebruik t.o.v. controle ($NaCl$), doordat er minder zuurstof nodig is voor de ATP-productie.⁴ Natrium-nitraat inname verlaagde ook de infarct-grootte in muizen na toepassing van ischemie-reperfusie.⁵

Een afname van het zuurstofverbruik, zal leiden tot een hogere pO_2 in weefsels, zoals de plaque.

Studies in de literatuur beschrijven de pro-atherogene effecten van lage zuurstofspanning: meer inflammatie en apoptose, en een slechtere opruiming van dode cellen (fagocytose).⁵ Deze studies en de anti-atherogene effecten van ons recente onderzoek, leiden tot de hypothese dat inname van nitraat de lage pO_2 in de atherosclerotische plaque kan verhogen en plaque ontwikkeling zal remmen.

Het effect van nitraat inname zal onderzocht worden op 3 manieren:

1. Nitraat inname en ontstaan van atherosclerotische plaques
2. Nitraat inname en progressie van bestaande atherosclerotische plaques
3. Nitraat en de opruiming van dode cellen vitro

1. Nitraat inname en initiatie van atherosclerotische plaques

Het zuurstofverbruik zal verlaagd worden door inname van nitraat. Deze therapie zal dus leiden tot een hogere plaque pO_2 en we verwachten hierdoor minder inflammatie en een verbeterde opruiming van dode cellen. Nitraat inname zal het ontstaan van plaques dus verminderen.

LDLR-KO muizen zullen op een westers dieet geplaatst worden gedurende 16 weken en nitraat via het drinkwater toegediend krijgen.

2. Nitraat inname en progressie van bestaande atherosclerotische plaques

In het tweede experiment wordt carbogeen therapie gestart nádat plaques met een lage pO_2 zich hebben gevormd (van Gink&Sluimer, ongepubliceerde resultaten, DEC 2010-018).

Dieren worden op dieet gezet voor de gehele duur van het experiment (16 weken) en nitraat inname via het drinkwater zal vanaf 8 weken plaatsvinden (nádat plaques gevormd zijn) tot aan week 16.

3. Nitraat en de opruiming van dode cellen in vitro

De ophoping van dode cellen in atherosclerotische plaques wordt veroorzaakt door een gebrekkige opruiming van dode cellen (fagocytose) door macrofagen, wat leidt tot grotere necrotische kernen.⁶⁻⁷ De oorzaak hiervan is nog niet volledig duidelijk, maar recente *in vitro* studies toonden aan dat een lage pO_2 verantwoordelijk kan zijn.⁵ Ook de zuurstof-verhogende carbogeen therapie liet zien dat de plaques een kleinere kern bevatten. Een kleinere kern zal dus waarschijnlijk worden veroorzaakt door afname in apoptose en fagocytose.

Doel van deze studie is vast te stellen of nitraat inname de geblokkeerde fagocytose kan herstellen. Beenmerg macrofagen worden verzameld voor in vitro experimenten naar het exacte moleculaire mechanisme van gebrekkige fagocytose en celdood met behulp van onderdrukking (mbv siRNA) en stimulatie (lentivirale constructen) van additionele fagocytose/celdood genen. Daarnaast zullen de effecten van nitraat op mitochondriale zuurstofconsumptie en ATP productie bepaald worden.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is wetenschappelijk positief beoordeeld door de PI.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Gebruikt worden LDLr knock-out muizen (LDLr-KO) met een C57Bl6 achtergrond, omdat deze muizen onder invloed van een cholesterolrijk dieet atherosclerose ontwikkelen op een manier die vergelijkbaar is met de menselijke (hypercholesterolemische) situatie. De LDLr-KO en Wt/Bl6 dieren zullen worden geleverd vanuit de CPV fok. Aangezien alle dieren aan het einde van het experiment geofferd zullen worden, zijn ze niet beschikbaar voor hergebruik.

7b. Sexe

Om het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken gaat de voorkeur uit naar het gebruik van één geslacht. Atherosclerotische plaques verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke LDLrKO muizen. Het gebruik van twee geslachten zal resulteren in een grotere standaard variatie en dus in een hoger aantal benodigde muizen. Ivm met vergelijkbaarheid met een eerdere studie (DEC 2010-018) zullen mannelijke muizen gebruikt worden.

Voor de in vitro experimenten zullen muizen van beide geslachten gebruikt worden aangezien er geen indicaties zijn voor verschillen tussen de geslachten met betrekking tot deze onderzoeken.

7.c. Aantallen

Er zullen 3 verschillende experimenten worden uitgevoerd;

1. Nitraat inname en ontstaan van atherosclerotische plaques
2. Nitraat inname en progressie van bestaande atherosclerotische plaques
3. Zuurstofspanning en de opruiming van dode cellen vitro

1 Nitraat inname en ontstaan van atherosclerotische plaques

Voor deze studie zijn in totaal 40 dieren nodig. Er zullen 2 groepen LDLR-KO dieren gebruikt worden binnen deze studie

Groep 1: LDLR-KO controle	20
Groep 2: LDLR- KO nitraat	20
Totaal	40

2 Nitraat inname en progressie van bestaande atherosclerotische plaques

Voor deze studie worden ook 40 dieren gebruikt verdeeld over 2 groepen LDLR-KO dieren.

Groep 3: LDLR-KO controle	20
Groep 4: LDLR-KO nitraat	20
Totaal	40

3 Nitraat en de opruiming van dode cellen in vitro wordt bestudeerd in beenmerg macrofagen gebruikt worden.

De in vitro experimenten zijn essentieel om het exacte moleculaire mechanisme te bepalen met behulp van additionele genetische onderdrukking/stimulering.

Groep 5: WT	56
-------------	----

Powerberekening:

1 t/m 2. Op basis van eerdere atherosclerose studies binnen onze groep weten we dat de gemiddelde $\sigma = 47,5$ en $\delta = 45$ (plaque oppervlakte als uitleesparameter). Volgens de formule van L. Sachs ($n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$ met (80% betrouwbaarheid): $F(2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2) 0.8 = 15.7$. $n = 15.7 * (\sigma/\delta)^2$) hebben we $n = 15.7 * (47.5/45)^2$ muizen nodig, hetgeen overeenkomt met een aantal van ($n =$) 17,5 dieren per groep. Met in acht name van 10% uitval (door bv. olifantstanden, huidproblemen, verlies bij verwerken afgenomen materiaal) kunnen we bepalen dat we 19,4 dieren nodig hebben. Dus 20 dieren per groep zou voldoende moeten zijn voor de studie.

3. Voor in vitro experimenten zullen 8 dieren per experiment gebruikt worden. De expressie van fagocytose receptoren in macrofagen van 4 muizen wordt gestimuleerd/onderdrukt en vergeleken met 4 controles. Ervaring leert dat vier muizen voldoende cellen op leveren om alle benodigde metingen uit te voeren (opruiming van dode cellen, celdood, cytokine productie, expressie fagocytose receptoren). Dit betekent dus 8 dieren per genotype per experiment.

Uit eerdere experimenten (Kanters et al. JCI 2003) is gebleken dat er enige variatie in tijd is als de experimenten herhaald worden. De eerdere variatie was 30%, en met een gemiddeld effect op celdood van 50%, komen we mbv het PS program op 7x herhalen van de experimenten (er is praktisch geen uitval bij deze proeven). Echter de praktijk kan uitwijzen dat we bij bepaalde experimenten met minder herhaling toekunnen. We vragen dus dieren aan voor 7 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.

In totaal zullen er dus maximaal $7 \times 8 = 56$ muizen worden gebruikt.

TOTAAL:

In totaal zullen voor deze studie $(40 + 40 + 56) = 136$ dieren worden gebruikt.

8. Experiment

1. Nitraat en ontstaan van atherosclerose

Muizen:

LDLr-KO muizen + controle (20 mannelijke muizen)

LDLr-KO muizen + nitraat (20 mannelijke muizen)

Week 0-16 Hoogvet dieet (Western Type Diet: WTD) (0,25% cholesterol)

Week 0-16 Natrium-nitraat (1g/L) of NaCl in drinkwater

Week 0-16 1x/4wk bloedafname voor serum nitrate/nitrite/NO

Week 0-16 1x/4wk bloeddrukbeplating

Week 16: Offeren van dieren en extractie van carotiden, aortaboog, hart, milt, lymfeknopen en bloed.

Elk 4 weken (totaal 4x) zal bij de dieren de bloeddruk bepaald worden via tailcuff (door art. 12 functionaris)⁸ en een bloedmonster (2 – 4 druppels) worden afgenomen via de vena saphena (CPV-3-MR) voor analyse. Bij het offeren zal een bloedmonster worden afgenomen via een hartpunctie (cholesterol, Nitrate, nitrite, NO levels) en tevens zullen carotiden, aortaboog, hart, milt en lymfeknopen worden uitgenomen voor verdere analyse (bepaling plaque grootte en samenstelling, macrofagen, dode cellen en angiogenese in de plaque e.d.). Alle analyses zullen geblindeerd uitgevoerd worden en de dieren zullen gerandomiseerd over de groepen verdeeld worden. De handelingen zullen voor alle groepen zullen op dezelfde wijze en volgens (werk)protocol worden uitgevoerd.

2. Nitraat en ontwikkeling van bestaande atherosclerotische plaques

Muizen:

LDLr-KO muizen + controle (20 mannelijke muizen)

LDLr-KO muizen + nitraat (20 mannelijke muizen)

Week 0-16 Hoogvet dieet (Western Type Diet: WTD) (0,25% cholesterol)

Week 8-16 Natrium-nitraat (1g/L) of NaCl in drinkwater

Week 8-16 1x/4wk bloedafname voor serum nitrate/nitrite/NO

Week 8-16 1x/4wk bloeddrukbeplating

Week 16: Offeren van dieren en extractie van carotiden, aortaboog, hart, milt, lymfeknopen en bloed, zoals vermeld bij exp 1.

3: Nitraat en de opruiming van dode cellen in vitro

Beenmerg macrofagen worden verzameld voor in vitro experimenten naar fagocytose, celdood mitochondriale zuurstofconsumptie, en ATP productie. Moleculaire mechanismen zullen ontrafeld worden met behulp van onderdrukking (mbv siRNA) en stimulatie (lentivirale constructen) van relevante genen. Daarnaast zullen de effecten van die veranderingen op cytokine productie en expressie relevante genen bepaald worden.

9. Experimentele condities**9a. Anesthesie**

nvt

9b. Pijnbestrijding

nvt

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Euthanasie bij de dieren voor experiment 1 t/m 2 (groep 1 t/m 4) gebeurt middels verbloeding onder pentobarbital-anesthesie (1:10 verdund in NaCl, 100 mg/kg (~200 µl) i.p). Dieren in experiment 3 (groep 5-6) worden geëuthaniseerd dmv een overdosis CO₂/O₂ gevolgd door cervicale dislocatie.
- Dieren zullen in overleg met de artikel 14 functionaris en VO uit experiment genomen worden. Indien er sprake is van ernstig ongerief zoals 'wasting syndrome' (10-15% gewichtsverlies, slecht onderhouden vacht, slecht eten, algemene zwakte), of onvoorziene infecties zal het desbetreffende dier worden geëuthaniseerd.

Zorg**10a. Ongerief**

Alle muizen zullen in groepen worden gehuisvest.

			Diergroep	
			Exp1+2	Exp 3
		# voorblad	1-4	5-6
Aard	Duur	Frequentie		
Dieet	16 wk	dagelijks	01	nvt
Nitraat	8-16 wk	dagelijks	01	nvt
Bloedafname	10min	1x/4wk	02	Nvt
Bloeddruk tailcuff	30min	1x/4wk	02	nvt
Euthanasie pento	10 min	1x	02	nvt
Euthanasie CO ₂	5min	1x	nvt	01
totaal			02	01

10b. Welzijnsevaluatie

Op basis van ervaringen met dieetstudies en de eigen afdeling blijkt dat de ingeschatte ongeriefscore realistisch is. Er zal een welzijnsdagboek worden bijgehouden van alle dieren en na afloop van het experiment zal er een evaluatie geschreven worden.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden gehuisvest en verzorgd in de Centrale Proefdier Voorziening (CPV) van de Universiteit Maastricht (UM), onder de daar geldende condities en normen (groepshuisvesting). De muizen zullen in standaard kooien worden gehuisvest, waarbij water en voer ad libitum beschikbaar is. De dieren voor experiment 1 t/m 2 zullen gedurende het experiment een western type dieet krijgen met 0,25% cholesterol en 15% cacaoboter, waarna de dieren voor de diverse onderzoeken ingezet zullen worden en uiteindelijk zullen worden geofferd. De dieren in andere studie 3 zullen een normaal dieet krijgen.

De verantwoordelijke onderzoeker (VO) (en/of diens vervanger (VVO) dragen zorg voor de controle op de dieren in de proef in overleg met de medewerkers van het CPV. In geval van calamiteiten wordt contact opgenomen met de artikel 14 functionaris en VO/VVO.

12. Deskundigheid

Alle betrokkenen zijn bevoegd en bekwaam voor de beschreven procedures.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Dieet samenstelling:

15% cacao boter, 1% maïs olie, 0.25% cholesterol, 40.5% sucrose, 10% maïs zetmeel, 5.95% cellulose (Special Diets Services).

Offeren: De dieren in groep 1 t/m 6 zullen worden geëuthaniseerd middels een overdosis pentobarbital (1:10 verdund in NaCl, 100 mg/kg (~200 µl) i.p)

Relevante literatuur

1. Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, Cleutjens JP, van den Akker LH, Corvol P, Wouters BG, Daemen MJ, Bijnens AJJ. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1258-1265.
2. Sluimer JC, Daemen MJ. [New understanding of the onset of atherosclerosis--angiogenesis and hypoxia play a crucial role]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2009;153:A847.
3. Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol*. 2009;218:7-29.
4. Filip J. Larsen, Tomas A. Schiffer, Sara Borniquel, Kent Sahlin, Björn Eklom, Jon O. Lundberg, Eddie Weitzberg. Dietary Inorganic Nitrate Improves Mitochondrial Efficiency in Humans. *Cell Metabolism* 2011; 13 (2): 149-159
5. Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL, Hast BE, Hanna SC, Wondergem B, Furge KA, Irwin MS, Kim WY, Teh BT, Grinstein S, Park M, Marsden PA, Ohh M. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nat Med*. 2009;15:319-324.
6. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1256-1261.
7. Tabas I. Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis. *Curr Drug Targets*. 2007;8:1288-1296.
8. Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Oct;287(4):H1618-24.



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 : N

Maastricht, 19-12-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Het effect van nitraat op de zuurstofspanning en de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque*", is op de DEC vergadering van 16 december 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De DEC verzoekt op het voorblad de code voor anesthesie aan te passen in code 01.
- 2) De DEC verzoekt de naam van de PI bij punt 6 te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 3) Bij punt 9a verzoekt de DEC aan te geven welke groepen anesthesie krijgen en bij 9c welke groepen euthanasie krijgen. Dit moet in overeenstemming zijn met het voorblad.

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 2011-167, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

De DEC-UM wenst u en uw familie fijne feestdagen en een voorspoedig en vooral gezond 2012!

Hoogachtend,

a
Voorzitter DEC-UM

Aan: Dier Ethische Commissie
Betreft: Aanpassing opzet DEC 2011-167

Maastricht, 5 januari 2012

Geachte DEC,

Bij deze licht ik uw vragen en opmerkingen toe, betreffende projectaanvraag: *“Het effect van nitraat op de zuurstofspanning en de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque”*.

- De code voor anesthesie op het voorblad is aangepast in code 01.
- De naam van de PI bij punt 6 is verwijderd.
- Punt 9a en 9c: Er wordt enkel euthanasie toegepast d.m.v. een overdosis pentobarbitol. Per abuis had ik dit ook onder anesthesie geschaard, wat niet correct is. Dit is nu in overeenstemming met het voorblad.
- Alle aanpassingen zijn in grijs gemarkeerd.

Voor eventuele vragen ben ik beschikbaar op onderstaand telefoonnummer.

Met vriendelijke groet,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
10-01-2012

Project: *Het effect van nitraat op de zuurstofspanning en de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

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

Secretariaat DEC-UM
T (043)

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-167
Diersoort: muis
Aantal dieren: 136
Einddatum: 10-01-2016

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

Vicevoorzitter DEC-UM