

139

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-088

Versie 2006:

Herziene versie

Ontvangen: 04-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
13-07-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

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

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

Budgetnummer	30983293B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Remming van actieve vs. inactieve endotheline-receptoren

startdatum 1-8-2011

einddatum 9 31-7-2015

Duur van de proef¹⁰: 1 dag

	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	
3. Verantwoorde- lijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art.12	
5.					
6. P.I.				1 Art.12	
				Art.9	

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	Exp						
Diersoort	02						
Stam	WKY						
Construct / mutatie ?	nee						
Herkomst (leverancier) *	01						
Aantal	70						
Geslacht	Man						
Dieren immuuncompetent ?	Ja	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	16 weken						
Doel van de proef *	31						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	01						
Anesthesie *	04						
Pijnbestrijding *	04						
Mate ongerief *	02						
Toestand dier einde exp*	01						

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

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

Titel: Remming van actieve vs. inactieve endotheline-receptoren

1. Doel van de proef.

De bloeddruk in het menselijk lichaam wordt gereguleerd door, onder andere, de weerstand die het bloed in bloedvaten ondervindt. Deze weerstand wordt bepaald door de contractiele status van weerstandsvaten. Deze vaten bestaan uit endotheelcellen, gladde spiercellen en bijv. sensor-motorzenuwen.

Endotheelcellen produceren vaso-actieve stoffen en kunnen daardoor de contractiele status van de bloedvaten beïnvloeden. Eén van de door endotheelcellen geproduceerde is endotheline-1 (ET-1). ET-1 bindt aan twee receptoren: ET_A en ET_B. Wanneer ET-1 bindt aan de ET_A-receptoren, die zich voornamelijk op de gladde spiercellen bevinden, trekken de gladde spiercellen samen. Wanneer ET-1 bindt aan de ET_B-receptoren, die zich vooral op de endotheelcellen, resulteert dit in een relaxatie van de gladde spiercellen door dat de gladde spiercellen NO zullen uitscheiden.

Activatie van receptoren wordt in de farmacologie gezien als een tijdelijk fenomeen. De receptor wordt actief wanneer de agonist (de activerende stof) bindt en activatie stopt als de agonist wordt verwijderd. Echter, in tegenstelling tot dit klassieke model van receptor-activatie stopt de activatie van de ET_A-receptor niet, wanneer ET-1 (de agonist) wordt verwijderd.

Recent werk in ons lab heeft aangetoond dat antagonist (stoffen die wel op de receptor binden, maar niet activeren) ET-1 niet van de receptor kunnen verwijderen maar slechts de activatie remmen. Een nieuwe klasse antagonist lijkt echter een grotere remmende werking te hebben op een geactiveerde receptor dan op een inactieve receptor in *in vitro* experimenten. Met andere woorden: de antagonist werkt voornamelijk tegen receptoren die geactiveerd zijn.

Hypertensie, een aandoening gekenmerkt door onder andere verhoogde activiteit van het ET-systeem, is een steeds groter wordend probleem. Een antagonist die voornamelijk werkt tegen geactiveerde receptoren biedt daarom interessante therapeutische voordelen, omdat voornamelijk verhoogde activiteit een doelwit moet zijn voor de antagonist. Hierdoor kunnen bijwerkingen op minder actieve systemen beperkt worden.

Daarom test dit project de volgende hypothese:

Een nieuwe antagonist is effectiever tegen een geactiveerde receptor dan tegen een inactieve receptor.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Weerstandsvaten spelen een belangrijke rol bij de bloeddrukregulatie. Wanneer deze rol wordt verstoord, resulteert dit in hoge bloeddruk.

Hoge bloeddruk kan bijdragen aan het ontstaan van ernstige ziektebeelden zoals hart- en nierfalen, herseninfarct en atherosclerose. Daarom is er vraag naar middelen die de bloeddruk verlagen. Wij verwachten hier een bijdrage aan te kunnen leveren met de experimenten die we gepland hebben.

3. Alternatieven

Vervanging: de effecten van nieuwe versus "klassieke" antagonist zijn *in vitro* getest op

weerstandsvaten van de rat, en de bevindingen dienen nu *in vivo* te worden bevestigd. Dit geeft inzicht in de effecten van de antagonisten op de geactiveerde en inactieve receptoren *in vivo*, in een gewerveld diemodel. De toegepaste farmaca zijn niet toegestaan voor humaan gebruik.

Vermindering: gezien de onomkeerbaarheid van de binding van ET-1 aan de ET_A-receptor, kan er geen seriële, 2^{de} toevoeging van ET-1 aan het dier gebeuren. Waar mogelijk worden de experimenten wel serieel uitgevoerd.

Verfijning: dit is verder niet mogelijk, omdat bloeddrukmetingen alleen in levende dieren gedaan kunnen worden. De metingen vinden plaats onder anesthesie om het ongerief zoveel mogelijk te beperken.

4. Ethische afweging

Hypertensie en andere cardiovasculaire aandoeningen zijn de voornaamste doodsoorzaken in onze westerse wereld. Dit onderzoek kan leiden tot medicijnen die een nieuw aspect van bloeddrukregulatie aanpakken, namelijk langdurige vasoconstrictie geïnduceerd door ET-1, om zo hypertensie te behandelen. Vanwege het sterke maatschappelijke en wetenschappelijke belang van deze proef en rekening houdend met het geringe ongerief voor de rat is de keuze voor dit proefdier te rechtvaardigen.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Endotheline-1 (ET-1) is een, onder andere door endotheelcellen geproduceerde vasoconstrictor (Yanagisawa, 1988). Verder is er in het lichaam een rol voor ET-1 bij inflammatie, celdeling en zorgt voor proliferatie van verschillende celtypen wat bijv. hypertrofie van de vaatwand in de hand werkt.

De effecten van ET-1 worden gekenmerkt door een lange duur. Zowel in weefselpreparaten (Meens, 2010) als *in vivo* (Meens, 2011) zorgt het bijv. voor langdurige contracties van gladde spiercellen in de vaatwand. Dit leidt, *in vivo*, vervolgens tot langdurige bloeddrukstijging.

De langdurige effecten van ET-1 maken de huidige therapieën (zoals ET-receptor antagonisten) niet geschikt om op korte termijn iets te doen aan bijv. hypertensie, die veroorzaakt worden een verhoogde activiteit van het ET-1 systeem (Kohan, 2008). De verhoogde activiteit zal een aanzienlijke tijd aanhouden vanwege de langdurige ET-effecten.

Daarom zijn wij op zoek naar mogelijke acute behandelingen van hypertensie. In orgaanbadstudies hebben wij inmiddels een nieuw soort antagonist gevonden, dat het ET-effect beter remt, wanneer ET-1 op de receptor is gebonden en deze heeft geactiveerd, dan wanneer het de binding van ET-1 probeert te remmen op een nog onbezette receptor.

Omdat onze resultaten in orgaanbadstudies hoop bieden op een goed werkende therapie, willen wij deze resultaten nu graag verifiëren in een *in vivo* model. In een *in vivo* model als de rat is het namelijk, naast de *in vivo* verificatie van ons model, ook mogelijk systemische effecten te bestuderen. Ook kunnen er in een *in vivo* model tegelijkertijd verschillende vaatbedden bekeken worden, zodat er meer informatie uit één dier gehaald kan worden.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project maakt deel uit van het Nederlandse Top Institute Pharma, waardoor het onderzoeksonderwerp beoordeeld en akkoord bevonden is door de Federatie voor Innovatief Geneesmiddel Onderzoek Nederland (FIGON).

Deze DEC-aanvraag is beoordeeld en akkoord bevonden door
(zie voorblad).

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

We maken gebruik van 16 weken oude WKY ratten van een erkende fokinstelling. We kiezen voor WKY ratten omdat dit een veelgebruikte stam is in het betreffende onderzoeksveld, zo kan er gebruik worden gemaakt van historische controles. Omdat tussen verschillende series ratten echter een natuurlijke variatie zit in de responses op ET-1, is het helaas niet mogelijk om een historische controlegroep te gebruiken als controlegroep in deze studie. De historische controles dienen dus vooral ter indicatie van de te gebruiken concentraties van agonist en antagonist. Daarnaast is het eerdere *in vitro* werk ook op vaten van WKY ratten gedaan. De dieren zullen na de proef opgeofferd worden

7b. Sexe

Er zijn grote verschillen tussen mannen en vrouwen wat betreft het risico op het ontstaan van cardiovasculaire aandoeningen, mannen lopen een groter risico. Mogelijk speelt ET-1 bij dit verschil een rol (Tostes et al., 2008).

7c. Aantallen

Om de eerdergenoemde hypothese te kunnen testen, moet eerst het effect van ET-1 in onze setting getest worden (groep 1, controlegroep). Vervolgens wordt het effect van voorbehandeling met een **klassieke** ET-receptor antagonist getoetst (dus bij een inactieve receptor) op de door ET-1 geïnduceerde bloeddrukstijging (groep 2). Deze zelfde antagonist zal daarna getoetst worden wanneer de door ET-1 geïnduceerde bloeddrukstijging al is ontstaan (dus bij een geactiveerde receptor) (groep 3).

Vervolgens wordt het effect van voorbehandeling met de **nieuwe** ET-receptor antagonist getoetst (dus bij een inactieve receptor) op de door ET-1 geïnduceerde bloeddrukstijging (groep 4). Deze zelfde antagonist zal daarna getoetst worden wanneer de door ET-1 geïnduceerde bloeddrukstijging al is ontstaan (dus bij een geactiveerde receptor) (groep 5).

Bij voorgaande experimenten waarbij *in vivo* bloeddrukmetingen zijn verricht, is een SEM gevonden van $\pm 15\%$ van het gemiddelde bij een groeps grootte van $n=8$. Dit betekent een variatiecoëfficiënt van $\sqrt{(8-1)*15}\approx 27\%$. Bij berekening van het benodigde aantal proefdieren voor een verantwoorde proefdieropzet is gebruik gemaakt van de powerberekening uit het Handboek Proefdierkunde. Bij een tweezijdige toetsing met een Student's T-test met een betrouwbaarheidsdrempel van 5% ($\alpha=0.05$) en een onderscheidingsvermogen van 80% ($\pi=0.8$) geldt:

$$(z_{\alpha/2} - z_{\pi}) = \sqrt{(n/2)} * (\mu_1 - \mu_2) / \sigma.$$

De z-punten van de gestandaardiseerde normaalverdeling zijn. $z_{0.025}=1.96$ en $z_{0.8}=-0.84$. In de experimenten willen wij een verschil tussen de twee testgroepen kunnen meten van 30% dus $(\mu_1 - \mu_2)=30$ en $\sigma=27$ zoals boven berekend. Invullen levert $1.96 - (-0.84) = \sqrt{n/2} * 30 / 27 \rightarrow \sqrt{n/2} = 2.8 / 1.1 \rightarrow \sqrt{n/2} = 2.54 \rightarrow n/2 = 6.54 \rightarrow n = 13$.

De uitval bij de metingen (canulatie ivm bloeddrukmetingen en acute farmacologische interventies) is 5% . Om in de groepen uiteindelijk 13 dieren met succes te meten betekend dit dat we $13 / (1 - 0.05) = 14$ dieren per groep zullen moeten onderzoeken.

Totaal aantal dieren: $5 * 14 = 70$ mannelijke dieren

8. Experiment

Controlegroep 1:

Bloeddrukmeting en acute farmacologische interventies 1 (WKY, n=14, per groep):

Onder isofluraan anesthesie worden de vena femoralis vrijgeprepareerd (in deze vene zullen de verschillende farmaca worden toegediend en vanuit deze vene zullen bloedsamples worden genomen) en gecanuleerd. Daarnaast wordt een canule geïmplanteerd in de arteria femoralis, deze wordt opgeschoven naar de abdominale aorta om daar bloeddruk te kunnen meten. Vervolgens wordt een ultrasone flowprobe om de arteria mesenterica cranialis en de renale arterie geplaatst. Dan wordt de art. carotis vrijgeprepareerd en wordt ook daar een ultrasone flowprobe omheen geplaatst. Na het plaatsen van de canules en de probes wordt een bloedmonster genomen uit de vena femoralis (200 μ L) waarna een bolusinjectie ET-1 (0.1-30ng/kg) gegeven wordt in dezelfde vene. Daarna wordt gedurende een uur de bloeddruk bestudeerd en wordt er op de volgende tijdstippen weer een bloedmonster genomen (1, 2, 4 en 8 min). Na dit uur wordt het dier opgeofferd door middel van het toedienen van i.v. pentobarbital 200 mg/kg via de veneuze canule.

Experimenteel groep 2:

Bloeddrukmeting en acute farmacologische interventies 1 (WKY, n=14, per groep):

Onder isofluraan anesthesie worden de vena femoralis vrijgeprepareerd (in deze vene zullen de verschillende farmaca worden toegediend en vanuit deze vene zullen bloedsamples worden genomen) en gecanuleerd. Daarnaast wordt een canule geïmplanteerd in de arteria femoralis, deze wordt opgeschoven naar de abdominale aorta om daar bloeddruk te kunnen meten. Vervolgens wordt een ultrasone flowprobe om de arteria mesenterica cranialis en de renale arterie geplaatst. Dan wordt de art. carotis vrijgeprepareerd en wordt ook daar een ultrasone flowprobe omheen geplaatst. Na het plaatsen van de canules en de probes wordt een bloedmonster genomen uit de vena femoralis (200 μ L), waarna een bolusinjectie van de klassieke antagonist (BQ123) (0.3-10mg/kg) wordt gegeven in deze vene. Hierna volgt een bolusinjectie ET-1 (0.1-30 ng/kg) in dezelfde vene. Daarna wordt gedurende een uur de bloeddruk gemonitord en wordt er op de volgende tijdstippen weer een bloedmonster genomen (1, 2, 4 en 8 min). Na dit uur wordt het dier opgeofferd door middel van het toedienen van i.v. pentobarbital 200 mg/kg via de veneuze canule.

Experimenteel groep 3:

Bloeddrukmeting en acute farmacologische interventies 1 (WKY, n=14, per groep):

Onder isofluraan anesthesie worden de vena femoralis vrijgeprepareerd (in deze vene zullen de verschillende farmaca worden toegediend en vanuit deze vene zullen bloedsamples worden genomen) en gecanuleerd. Daarnaast wordt een canule geïmplanteerd in de arteria femoralis, deze wordt opgeschoven naar de abdominale aorta om daar bloeddruk te kunnen meten. Vervolgens wordt een ultrasone flowprobe om de arteria mesenterica cranialis en de renale arterie geplaatst. Dan wordt de art. carotis vrijgeprepareerd en wordt ook daar een ultrasone flowprobe omheen geplaatst. Na het plaatsen van de canules en de probes wordt een bloedmonster genomen uit de vena femoralis (200 μ L) waarna een bolusinjectie ET-1 (0.1-30 ng/kg) gegeven wordt in dezelfde vene. Hierna volgt een bolusinjectie van de klassieke antagonist (BQ123) (0.3-10mg/kg). Daarna wordt gedurende een uur de bloeddruk bestudeerd en wordt er op de volgende tijdstippen weer een bloedmonster genomen (1, 2, 4 en 8 min). Na dit uur wordt het dier opgeofferd door middel van het toedienen van i.v. pentobarbital 200 mg/kg via de veneuze canule.

Experimenteel groep 4:

Bloeddrukmeting en acute farmacologische interventies 1 (WKY, n=14, per groep):

Onder isofluraan anesthesie worden de vena femoralis vrijgeprepareerd (in deze vene zullen de

verschillende farmaca worden toegediend en vanuit deze vene zullen bloedsamples worden genomen) en gecanuleerd. Daarnaast wordt een canule geïmplanteerd in de arteria femoralis, deze wordt opgeschoven naar de abdominale aorta om daar bloeddruk te kunnen meten. Vervolgens wordt een ultrasone flowprobe om de arteria mesenterica cranialis en de renale arterie geplaatst. Dan wordt de art. carotis vrijgeprepareerd en wordt ook daar een ultrasone flowprobe omheen geplaatst. Na het plaatsen van de canules en de probes wordt een bloedmonster genomen uit de vena femoralis (200 μ L), waarna een bolusinjectie van de nieuwe antagonist (0.3-10mg/kg) wordt gegeven. Dan volgt een bolusinjectie ET-1 (0.1-30 ng/kg) in dezelfde vene. Daarna wordt gedurende een uur de bloeddruk bestudeerd en wordt er op de volgende tijdstippen weer een bloedmonster genomen (1, 2, 4 en 8 min). Na dit uur wordt het dier opgeofferd door middel van het toedienen van i.v. pentobarbital 200 mg/kg via de veneuze canule.

Experimenteel groep 5:

Bloeddrukmeting en acute farmacologische interventies 1 (WKY, n=14, per groep):

Onder isofluraan anesthesie worden de vena femoralis vrijgeprepareerd (in deze vene zullen de verschillende farmaca worden toegediend en vanuit deze vene zullen bloedsamples worden genomen) en gecanuleerd. Daarnaast wordt een canule geïmplanteerd in de arteria femoralis, deze wordt opgeschoven naar de abdominale aorta om daar bloeddruk te kunnen meten. Vervolgens wordt een ultrasone flowprobe om de arteria mesenterica cranialis en de renale arterie geplaatst. Dan wordt de art. carotis vrijgeprepareerd en wordt ook daar een ultrasone flowprobe omheen geplaatst. Na het plaatsen van de canules en de probes wordt een bloedmonster genomen uit de vena femoralis (200 μ L) waarna een bolusinjectie ET-1 (0.1-30 ng/kg) gegeven wordt in dezelfde vene. Dan volgt een bolusinjectie van de nieuwe antagonist (0.3-10mg/kg). Daarna wordt gedurende een uur de bloeddruk bestudeerd en wordt er op de volgende tijdstippen weer een bloedmonster genomen (1, 2, 4 en 8 min). Na dit uur wordt het dier opgeofferd door middel van het toedienen van i.v. pentobarbital 200 mg/kg via de veneuze canule.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Isofluraan: inleiden met 3 - 4 % en onderhouden met 1.5 – 2.5 %.

9b. Pijnbestrijding

De ratten worden voorbehandeld met 0.05 mg/kg buprenorphine (Temgesic).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De ratten zullen na het experiment worden opgeofferd door middel van i.v. pentobarbital 200 mg/kg via de veneuze canule.

De kans op mogelijke complicaties bij deze experimenten is klein, maar aanwezig. De voornaamste complicaties zijn een bloeding, een te hoge bloeddruk door toegediend ET-1 of een te lage bloeddruk door de toegediende antagonist. Indien deze of andere complicaties optreden zullen de dieren voortijdig geëuthanaseerd worden door de op het voorblad genoemde VO, op de hierboven genoemde wijze.

10a. Ongerief



De dieren zijn tijdens de proef geanestheseerd en er wordt gebruik gemaakt van pijnbestrijding.

aard: gering/matig ongerief (code 02)

frequentie: 1 keer (acuut)

duur: (hoelang duurt het experiment?) 2 uur

10b. Welzijnsevaluatie

-

11. Verzorging en huisvesting

Verzorging en huisvesting van de ratten vindt plaats volgens de normen van de centrale proefdiervoorziening aan de UM. De ratten zullen in groepshuisvesting gevestigd worden, met ad libitum voer en water. Bij calamiteiten zal de art. 14 gewaarschuwd worden.

12. Deskundigheid

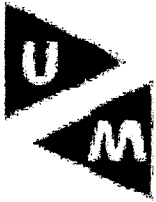
De proeven zullen worden uitgevoerd door de op het voorblad genoemde VO (art. 9). Initieel zal hij daarbij worden geassisteerd door één van de op het voorblad genoemde art. 12 functionarissen, welke ruime ervaring hebben in de bovengenoemde technieken.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Far-01-R

Relevante literatuur

- Yanagisawa M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Mar 31;332(6163):411-5.
- Meens MJPM, Compeer MG, Hackeng TM, van Zandvoort MA, Janssen BJA, et al. (2010) Stimuli of Sensory-Motor Nerves Terminate Arterial Contractile Effects of Endothelin-1 by CGRP and Dissociation of ET-1/ETA-Receptor Complexes. *PLoS ONE* 5(6): e10917. doi:10.1371/journal.pone.0010917
- Meens MJ, Mattheij NJ, Nelissen J, Lemkens P, Compeer MG, Janssen BJ, De Mey JG, Calcitonin Gene-Related Peptide Terminates Long-Lasting Vasopressor Responses to Endothelin 1 In Vivo. *Hypertension* 2011, epub ahead of print
- Kohan D Endothelin-1 and hypertension: from bench to bedside. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Feb;10(1):65-9. Review.
- Tostes RC et al. Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Jan;114(2):85-97. Review



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 29-06-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Remming van actieve vs. inactieve endotheline-receptoren*", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Bij punt 7a verzoekt de DEC aan te geven dat de dieren van een erkende fokinstelling komen en niet van Charles River Maastricht.
- Bij punt 7a merkt de DEC op dat er bij de keuze van het type proefdier, volgens de onderzoekers gebruikt gemaakt kan worden van historische controles. De DEC wijst erop dat in dat geval, dit gevolgen zou moeten hebben voor het aantal groepen en in het bijzonder dat dan een controlegroep weg gelaten zou kunnen worden.
- De DEC verzoekt bij punt 7b de zin "Om de hypothese enzovoort" te verwijderen.
- Bij punt 8 verzoekt de DEC de aantallen per groep aan te passen aan de werkelijke aantallen van het experiment.

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 2011-088, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 04/07/2011

Geachte

Bijgevoegd vindt u projectvoorstel 2011-088 genaamd "*Remming van actieve vs. inactieve endotheline-receptoren*".

Graag wil ik hierbij ingaan op de door de DEC verzochte aanpassingen.

- Bij punt 7a verzoekt de DEC aan te geven dat de dieren van een erkende fokinstelling komen en niet van Charles River Maastricht. **Dit is gewijzigd.**
- Bij punt 7a merkt de DEC op dat er bij de keuze van het type proefdier, volgens de onderzoekers gebruikt gemaakt kan worden van historische controles. De DEC wijst erop dat in dat geval, dit gevolgen zou moeten hebben voor het aantal groepen en in het bijzonder dat dan een controlegroep weg gelaten zou kunnen worden. **Dit heeft de volgende opheldering: "Omdat ruis en verschillende series ratten echter een natuurlijke variatie zijn in de respons op de test, het helaas niet mogelijk om een historische controlegroep te gebruiken als controle groep bij de studie. De historische controles dienen dus vooral ter indicatie van de te gebruiken concentraties van agonist en antagonist".**
- De DEC verzoekt bij punt 7b de zin "Om de hypothese enzovoort" te verwijderen. **Dit is gewijzigd.**
- Bij punt 8 verzoekt de DEC de aantallen per groep aan te passen aan de werkelijke aantallen van het experiment. **Dit is gewijzigd.**

Hopend de DEC hiermee voldoende te woord hebben gestaan, wacht ik de beslissing af.

Hoogachtend,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
13-07-2011**Project:** *Remming van actieve vs. inactieve endotheline-receptoren.*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)

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-088
Diersoort: rat
Aantal dieren: 70
Einddatum: 13-07-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM