

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Aanvrager: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Titel dierproef: Effect van foetale/neonatale hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel en

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.a

Stadia van de proef:

07-03-2007	Aangemeld	[REDACTED]
22-03-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
04-04-2007	Gekopieerd	[REDACTED]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van mijn aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden", in het kader van het voortgaande onderzoek van [REDACTED], en in de lijn van het onderzoek van [REDACTED] op het gebied van metabolisme. De staf van [REDACTED] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [REDACTED] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In dit aio-project wordt de rol van hyper- en hypothyroidie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoed waren. Deze ontwikkeling bleek te zijn vertraagd met 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen) in de testis. Dit experiment vormt een uitbreiding van proef 2006046. Uit deze proef bleek dat onder invloed van chronische hypothyreoidie de leptine niveaus in de vrouwelijke pups tot aan de puberteit met een factor 2 verhoogd waren. Dit verklaart waarschijnlijk waarom deze dieren ondanks hun lage lichaamsgewicht slechts met een geringe vertraging in de puberteit komen. Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreoidie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)) en de expressie van schildklierhormoon receptoren. In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen

schilddklierhormoon receptoren tot expressie breng en of schilddklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreoidie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schilddklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schilddklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus; zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diemodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoidie op organen zoals de lever, nier, schilddklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden bij volwassenen met hypothyreoidie

Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). De vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 14-03-2007 tot 31-10-2007

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	80	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	80	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreood
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 80	ratten		Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw 80	ratten		Controle dieet, 1e generatie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij XXXXXXXXXX

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht/spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi) gedurende een periode van maximaal 2 weken.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier en vetweefsel, en bloed worden verzameld. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan. (hiervoor moeten de dieren intact blijven). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per diët worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier speir- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de delingsactiviteit van neuronale stamcellen. Daartoe worden de dieren 2 uur voorafgaande aan de sectie geïnjecteerd met 150mg/kg lichaamsgewicht BromodeoxyUridine (BrdU), een marker voor celproliferatie.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Injectie (subcutaan) met Bromodeoxyuridine (mannetjes).

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypo moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht/spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi) gedurende een periode van maximaal 2 weken.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier en vetweefsel, en bloed worden verzameld. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan. (hiervoor moeten de dieren intact blijven). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per diët worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier speir- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de delingsactiviteit van neuronale stamcellen. Daartoe worden de dieren 2 uur voorafgaande aan de sectie geïnjecteerd met 150mg/kg lichaamsgewicht BromodeoxyUridine (BrdU), een marker voor celproliferatie.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Injectie (subcutaan) met Bromodeoxyuridine (mannetjes).

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypo moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Hypo moederdieren Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Controle moederdieren Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Controle man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Controle vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model dat de gonadale en hersenontwikkeling nabootst.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Afstudeervakstudenten die de cursus proefdierkunde hebben gevolgd. Deze namen worden nog doorgegeven wanneer bekend.

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	2
Hypothyroid man	1	02	1	80					01	1	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	80					01	1	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	1	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	1	1	1	2
Controle man	1	02	1	80					01	1	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	80					02	1	1	1	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.b

Stadia van de proef:

05-04-2007	Aangemeld	
17-04-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
24-04-2007	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyreoïdie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoïd waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoïdie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoïde pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze hypothyreoïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyreoïde pups gaan

kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puperteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met dr. [REDACTED], [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreoidie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie breng en of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreoidie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diemodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoidie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden bij volwassenen met hypothyreoidie. Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 25-04-2007 tot 04-12-2007

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	80	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	80	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreood
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man	80	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw	80	ratten	Controle dieet, 1e generatie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht/spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte

wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen. Voor dit laatste worden de dieren 2 uur voorafgaande aan de sectie geïnjecteerd met 150mg/kg lichaamsgewicht BromodeoxyUridine (BrdU), een marker voor celproliferatie.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Injectie (subcutaan) met Bromodeoxyuridine (mannetjes).

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypo moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypo moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

Afstudeervakstudenten die de cursus proefdierkunde hebben gevolgd. Deze namen worden nog doorgegeven wanneer bekend.

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	2
Hypothyroid man	1	02	1	80					01	1	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	80					01	1	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	1	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	1	1	1	2
Controle man	1	02	1	80					01	1	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	80					02	1	1	1	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.c

Stadia van de proef:

08-05-2007	Aangemeld	
10-05-2007	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
10-07-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
11-07-2007	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyreoïdie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoïd waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoïdie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoïde pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze

hypothyroïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyroïde pups gaan kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puberteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreoidie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie breng en of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreoidie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diemodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoidie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden bij volwassenen met hypothyreoidie. Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

1.c. Leksamenvatting:

2. Gepland vanaf: 16-05-2007 tot 04-12-2007

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreoid
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groeps grootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groeps grootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoide dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 150 dagen) the effecten van hypothyroidie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

[REDACTED]

5.a. Accommodatie:

[REDACTED]

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht/spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen. Voor dit laatste worden de dieren 2 uur voorafgaande aan de sectie geïnjecteerd met 150mg/kg lichaamsgewicht BromodeoxyUridine (BrdU), een marker voor celproliferatie.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosteron (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Injectie (subcutaan) met Bromodeoxyuridine (mannetjes).

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypo moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypo moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Afstudeervakstudenten die de cursus proefdierkunde hebben gevolgd. Deze namen worden nog doorgegeven wanneer bekend.

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.c (K14):

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

33 1 1 01

Bronstcontrole man	1	02	1	15	01	1	1	1	2
Hypothyroid man	1	02	1	75	01	1	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	75	01	1	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24	01	1	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21	01	1	1	1	2
Controle man	1	02	1	75	01	1	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	75	02	1	1	1	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.d

Stadia van de proef:

11-07-2007	Aangemeld	
12-07-2007	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
13-09-2007	Wijzigen	
13-09-2007	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyreoïdie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoïd waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoïdie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoïde pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze

hypothyroïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyroïde pups gaan kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puberteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreoidie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie brengen en of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreoidie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diersmodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoidie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden bij volwassenen met hypothyreoidie. Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 12-07-2007 tot 04-01-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreoid
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groepsgrootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groepsgrootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoide dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 150 dagen) the effecten van hypothyroidie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht/spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Regelmatig wegen (uitgezonderd de bronst controle mannen)

Solitair huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en

bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypo moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle moederdieren	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Controle vrouw	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypo moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[Redacted names of directly involved persons]

[Redacted] student heeft cursus proefdierkunde gevolgd
art. 12 - student gaat cursus proefdierkunde in september volgen

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.d (K14):

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

					33	1	1	01						
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	2	
Hypothyroid man	1	02	1	75					01	1	1	2	1	
Hypothyroid vrouw	1	02	1	75					01	1	1	2	1	
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	1	1	2	2	
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	1	1	1	2	
Controle man	1	02	1	75					01	1	1	2	1	
Controle vrouw	1	02	1	75					02	1	1	1	1	

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.e

Stadia van de proef:

13-09-2007	Aangemeld
13-09-2007	Goedgekeurd
02-10-2007	Wijzigen
02-10-2007	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyreoïdie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoïd waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoïdie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoïde pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze

hypothyroïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyreïde pups gaan kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puberteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreïdie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie breng en of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreïdie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diersmodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreïdie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden bij volwassenen met hypothyreïdie. Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 14-09-2007 tot 04-01-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreoid
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groeps grootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groeps grootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoide dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 150 dagen) the effecten van hypothyreoïdie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Nieuwedosisperchloraat	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

[REDACTED].

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht/spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoed te maken is bij de hypothyreoide groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). De vaginale lavages plaatsvinden in een periode van maximaal 2 weken rondom de geplande dag van sectie van het betreffende dier.

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

Verder willen wij 15 hypothyreode vrouwtjes op een perchloraat dieet zetten waar slechts 0,05% perchloraat aan is toegevoegd aan het drinkwater. Dit is dus een factor 10 minder dan wat wij tot op heden gebruikten. Wij willen deze dosis toepassen omdat deze dosis meer in de buurt komt van wat een veelgebruikte dosis perchloraat is in humane studies. Omdat eerdere studies met een lagere dosis perchloraat (lager dan 0,05%) een wisselende mate van succes hadden wat betreft het in stand houden van de hypothyreoidie willen wij niet lager gaan dan deze dosis. Het doel is om te kijken of de dieren eenzelfde gewichtsverloop hebben als hypothyreode dieren op een dosis van 0,5%. De dieren zullen worden opgeofferd op een leeftijd van 100 dagen. De gewichten zullen worden bepaald op een leeftijd van 35, 42, 50, 64, 76, 86 en 100 dagen.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering
Nieuwedosisperchloraat	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Regelmatig wegen (uitgezonderd de bronst controle mannen)

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes) (start maximaal twee weken rondom de geplande sectiedatum).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	D. Is wel toegepast.
Hypothyroid vrouw	D. Is wel toegepast.
Hypo moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle man	D. Is wel toegepast.
Controle vrouw	D. Is wel toegepast.
Nieuwedosisperchloraat	D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Nieuwedosisperchloraat	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypo moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Nieuwedosisperchloraat	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven

experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

- student heeft cursus proefdierkunde gevolgd

, art. 12 - student gaat cursus proefdierkunde in september volgen

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.e (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	75					02	4	1	1	1
Nieuwedosisperchloraat	1	02	1	15					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.f

Stadia van de proef:

02-10-2007	Aangemeld
03-10-2007	Goedgekeurd
10-10-2007	Wijzigen
10-10-2007	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyroidie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoid waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoidie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoid pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze

hypothyroïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyroïde pups gaan kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puberteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreoidie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie brengen en of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreoidie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diermodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoidie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden bij volwassenen met hypothyreoidie. Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 03-10-2007 tot 04-01-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreoid
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw 75	ratten		Controle dieet, 1e generatie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groepsgrootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groepsgrootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoidie dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 150 dagen) the effecten van hypothyreoidie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Nieuwedosisperchloraat	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

[REDACTED]

5.a. Accommodatie:

[REDACTED]

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht en na spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoid te maken is bij de hypothyreode groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). De vaginale lavages plaatsvinden in een periode van maximaal 2 weken rondom de geplande dag van sectie van het betreffende dier.

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 150 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd. Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteïnizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

Verder willen wij 15 hypothyreode vrouwtjes op een perchloraat dieet zetten waar slechts 0,05% perchloraat aan is toegevoegd aan het drinkwater. Dit is dus een factor 10 minder dan wat wij tot op heden gebruikten. Wij willen deze dosis toepassen omdat deze dosis meer in de buurt komt van wat een veelgebruikte dosis perchloraat is in humane studies. Omdat eerdere studies met een lagere dosis perchloraat (lager dan 0,05%) een wisselende mate van succes hadden wat betreft het in stand houden van de hypothyreoidie willen wij niet lager gaan dan deze dosis. Het doel is om te kijken of de dieren eenzelfde gewichtsverloop en schildklierhormoonstatus hebben als hypothyreode dieren op een dosis van 0,5%. De dieren zullen worden opgeofferd op een leeftijd van 50 dagen (7 ratten) en op een leeftijd van 100 dagen (de resterende 8 ratten). De gewichten zullen worden meerdere malen per week gemonitord, maar in ieder geval op de leeftijden van 35, 42, 50, 64, 76, 86 en 100 dagen.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering
Nieuwedosisperchloraat	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Regelmatig wegen (uitgezonderd de bronst controle mannen)

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes) (start maximaal twee weken rondom de geplande sectiedatum).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	D. Is wel toegepast.
Hypothyroid vrouw	D. Is wel toegepast.
Hypo moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle man	D. Is wel toegepast.
Controle vrouw	D. Is wel toegepast.
Nieuwedosisperchloraat	D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Nieuwedosisperchloraat	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypo moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Nieuwedosisperchloraat	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[Redacted text]

- student heeft cursus proefdierkunde gevolgd

, art. 12 - student gaat cursus proefdierkunde in september volgen

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.f (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	75					02	4	1	1	1
Nieuwedosisperchloraat	1	02	1	15					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.g

Stadia van de proef:

10-10-2007	Aangemeld	
23-10-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
25-10-2007	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyreoïdie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoïd waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoïdie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoïde pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze hypothyreoïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyreoïde pups gaan

kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puperteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyreoïdie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie brengen of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyreoïdie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

Uitbreiding direct en uiteindelijk doel: hexabromocyclododecane (HBCD) is een gebromeerde vlamvertrager die gebruikt wordt in de textielindustrie en bij het vervaardigen van piepschuim. Deze vlamvertrager komt uiteindelijk via ons dieet in het lichaam en hoopt zich daar op. De laatste jaren worden dan ook toenemende concentraties HBCD gevonden in het menselijk lichaam. HBCD is door verschillende onderzoekers als weinig toxisch bestempeld en HBCD heeft de laatste jaren dan ook wat minder aandacht gekregen dan recent noodzakelijk bleek. Vele onderzoeken hebben bij blootstelling variërend van 28 tot 90 dagen tot een dosis van 125 mg/kg lichaamsgewicht geen effecten laten zien. Recent onderzoek van het RIVM heeft laten zien dat een 28-daagse blootstelling aan HBCD in lagere doses echter wel effect heeft op verschillende fysiologische parameters in de hypofyse-schildklier-as (vanaf 30 mg/kg lichaamsgewicht). Recente studies bij de leerstoelgroep Toxicologie hebben laten zien dat HBCD in combinatie met T3 zowel in vitro, in vivo bij kikkers, als in weefselcultuur met staartjes van kikkervisjes de normale schildklierhormoonwerking sterk overstimuleerde tot meer dan het normale maximum. Bij normale dieren en mensen treedt naar verwachting geen effect op, maar in onze hypothyreoïde ratten zou HBCD wellicht een mogelijk gunstig effect kunnen hebben.

In het voorgestelde experiment willen wij hypothyreoïde en controle ratten (vrouwtjes) blootstellen aan een lage (3 mg/kg lichaamsgewicht) en een iets hogere (30 mg/kg) maar ruimschoots sublethale dosis HBCD gedurende een korte periode van 7 dagen. Vorig jaar hebben wij eenzelfde experiment uitgevoerd bij mannetjes. Wij hebben hierbij effecten gemeten op corticosterone (een verlagend effect) en leptine (een verlagend effect). TSH, T3 en T4 waren, in tegenstelling tot onze verwachtingen slechts veranderd in de controlegroep, en niet in de hypothyreoïde groep. Omdat vrouwtjes over het algemeen veel gevoeliger zijn hopen wij na 7 dagen positieve effecten op de schildklierhormoon huishouding waar te nemen. Omdat hypothyreoïde dieren gevoeliger zijn voor veranderingen in schildklierhormoon status hopen wij reeds na 7 dagen effecten te zien bij de dosis van 30 mg/kg (waar het RIVM kleine effecten begon te zien na 28 dagen bij blootstelling vanaf 30 mg/kg). Direct doel: leidt HBCD tot overstimulatie van de normale schildklierhormoonfunctie en kan het daarmee de gevolgen van hypothyreoïdie herstellen? Uiteindelijk doel: wat is het onderliggende mechanisme van de (eventuele) effecten van HBCD op schildklierhormoonwerking.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diersmodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoïdie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

Uitbreiding maatschappelijk belang:

Hexabromocyclododecane (HBCD) is een gebromeerde vlamvertrager die gebruikt wordt in de textielindustrie en bij het vervaardigen van piepschuim. Deze vlamvertrager komt uiteindelijk via ons dieet in het lichaam en hoopt zich daar op. De laatste jaren worden ook toenemende concentraties HBCD gevonden in het menselijk lichaam. HBCD is door verschillende onderzoekers als weinig toxisch bestempeld en HBCD heeft de laatste jaren dan ook wat minder aandacht gekregen dan recent noodzakelijk bleek uit experimenten waarin gevonden is dat HBCD de schildklierwerking beïnvloed. Middels het achterhalen van het werkingsmechanisme van HBCD en kwantificeren van haar effecten pogen wij een zo goed mogelijke risico-evaluatie te maken.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 26-10-2007 tot 04-01-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	65	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreoid
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten	Controle dieet, 1e generatie	
Controle vrouw 75	ratten	Controle dieet, 1e generatie	
Nieuwedosisperchloraat	15	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie, 0,05% perchloraat
HBCD 0, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 0 mg/kg HBCD
HBCD 3, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 3 mg/kg HBCD
HBCD 30, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 30 mg/kg HBCD
HBCD 0, hypo	6	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie, 0 mg/kg HBCD
HBCD 3, hypo	6	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie, 3 mg/kg HBCD
HBCD 30, hypo	6	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie, 30 mg/kg HBCD

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groepsgrootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groepsgrootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoïde dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 140 dagen) the effecten van hypothyreoïdie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Nieuwedosisperchloraat	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 0, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 3, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 30, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 0, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 3, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 30, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht en na spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). De vaginale lavages plaatsvinden in een periode van maximaal 2 weken rondom de geplande dag van sectie van het betreffende dier.

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 140 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd (m.u.v. dag 76 waarop geen vrouwtjes zullen worden opgeofferd). Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroïd stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosteron (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

Verder willen wij 15 hypothyreode vrouwtjes op een perchloraat dieet zetten waar slechts 0,05% perchloraat aan is toegevoegd aan het drinkwater. Dit is dus een factor 10 minder dan wat wij tot op heden gebruikten. Wij willen deze dosis toepassen omdat deze dosis meer in de buurt komt van wat een veelgebruikte dosis perchloraat is in humane studies. Omdat eerdere studies met een lagere dosis perchloraat (lager dan 0,05%) een wisselende mate van succes hadden wat betreft het in stand houden van de hypothyreoïdie willen wij niet lager gaan dan deze dosis. Het doel is om te kijken of de dieren eenzelfde gewichtsverloop en schildklierhormoonstatus hebben als hypothyreode dieren op een dosis van 0,5%. De dieren zullen worden opgeofferd op een leeftijd van 50 dagen (7 ratten) en op een leeftijd van 100 dagen (de resterende 8 ratten). De gewichten zullen worden meerdere malen per week gemonitord, maar in ieder geval op de leeftijden van 35, 42, 50, 64, 76, 86 en 100 dagen.

In de uitbreiding van het voorgestelde experiment met HBCD blootstelling willen wij hypothyreode en controle ratten (vrouwtjes) blootstellen aan een lage (3 mg/kg lichaamsgewicht) en een iets hogere (30 mg/kg) maar ruimschoots sublethale dosis HBCD gedurende een korte periode van 7 dagen. De ratten zullen vanaf dag 79 0,3 ml vanille vla met HBCD krijgen toegediend. Uit de voorgaande proef bleek dat de ratten dit zelf snel komen opeten wanneer dit dicht bij de bek wordt aangeboden. Na 7 dagen zullen de dieren volgens het bestaande protocol worden opgeofferd.

Om bestaande te kunnen combineren met de reeds goedgekeurde dierproef zullen wij de 5 vrouwtjes per

dieet die op dag 86 worden opgeofferd combineren met de 0 HBCD groep. Verder zullen wij dag 76 willen schrappen om in totaal 5 vrouwtjesdieren te besparen. In totaal hebben wij dan nog 1+1+6 dieren nodig (dus 8) per dieetgroep (hypo/controle) die nog extra zullen moeten worden opgeofferd buiten het voorheen totaal aantal aangevraagde dieren.

In totaal zijn er bij onze experimenten dit jaar veel meer vrouwtjes dan mannetjes geboren. Met de huidige uitbreiding van de proef hebben wij in totaal nog 4 controlevrouwtjes en 2 hypovrouwtjes, 4 controlemannetjes en 4 hypomannetjes over. Wij willen deze dieren als reserve aanhouden tot dag 125. Wij zullen deze dieren op dag 125 opofferen.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering
Nieuwedosisperchloraat	B. Gering/Matig
HBCD 0, controle	B. Gering/Matig
HBCD 3, controle	B. Gering/Matig
HBCD 30, controle	B. Gering/Matig
HBCD 0, hypo	B. Gering/Matig
HBCD 3, hypo	B. Gering/Matig
HBCD 30, hypo	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Regelmatig wegen (uitgezonderd de bronst controle mannen)

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes) (start maximaal twee weken rondom de geplande sectiedatum).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	D. Is wel toegepast.
Hypothyroid vrouw	D. Is wel toegepast.
Hypo moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle man	D. Is wel toegepast.
Controle vrouw	D. Is wel toegepast.
Nieuwedosisperchloraat	D. Is wel toegepast.
HBCD 0, controle	D. Is wel toegepast.
HBCD 3, controle	D. Is wel toegepast.
HBCD 30, controle	D. Is wel toegepast.
HBCD 0, hypo	D. Is wel toegepast.

HBCD 3, hypo D. Is wel toegepast.

HBCD 30, hypo D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypothyroid vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Hypo moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle moederdieren	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Controle vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Nieuwedosisperchloraat	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
HBCD 0, controle	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
HBCD 3, controle	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
HBCD 30, controle	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
HBCD 0, hypo	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
HBCD 3, hypo	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
HBCD 30, hypo	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Hypothyroid man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Hypo moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle moederdieren	Het dier is gedood na het einde van de proef.
Controle man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Nieuwedosisperchloraat	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
HBCD 0, controle	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
HBCD 3, controle	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
HBCD 30, controle	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
HBCD 0, hypo	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
HBCD 3, hypo	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
HBCD 30, hypo	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt in principe mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



- student heeft cursus proefdierkunde gevolgd
 , art. 12 - student gaat cursus proefdierkunde in september volgen
 - student heeft cursus proefdierkunde gevolgd in Groningen (copy examenresultaat bij [redacted]
 ingeleverd)

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.g (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	65					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	75					02	4	1	1	1
Nieuwedosisperchloraat	1	02	1	15					01	4	1	2	1
HBCD 0, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 3, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 30, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 0, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 3, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 30, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.h

Stadia van de proef:

25-10-2007	Aangemeld	
05-11-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
07-11-2007	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyroidie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoid waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoidie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoidie pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze

hypothyroïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyroïde pups gaan kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puberteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyroïdie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie brengen of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyroïdie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyroïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

Uitbreiding direct en uiteindelijk doel: hexabromocyclododecane (HBCD) is een gebromeerde vlamvertrager die gebruikt wordt in de textielindustrie en bij het vervaardigen van piepschuim. Deze vlamvertrager komt uiteindelijk via ons dieet in het lichaam en hoopt zich daar op. De laatste jaren worden dan ook toenemende concentraties HBCD gevonden in het menselijk lichaam. HBCD is door verschillende onderzoekers als weinig toxisch bestempeld en HBCD heeft de laatste jaren dan ook wat minder aandacht gekregen dan recent noodzakelijk bleek. Vele onderzoeken hebben bij blootstelling variërend van 28 tot 90 dagen tot een dosis van 125 mg/kg lichaamsgewicht geen effecten laten zien. Recent onderzoek van het RIVM heeft laten zien dat een 28-daagse blootstelling aan HBCD in lagere doses echter wel effect heeft op verschillende fysiologische parameters in de hypofyse-schildklier-as (vanaf 30 mg/kg lichaamsgewicht). Recente studies bij de leerstoelgroep Toxicologie hebben laten zien dat HBCD in combinatie met T3 zowel in vitro, in vivo bij kikkers, als in weefselcultuur met staartjes van kikkervisjes de normale schildklierhormoonwerking sterk overstimuleerde tot meer dan het normale maximum. Bij normale dieren en mensen treedt naar verwachting geen effect op, maar in onze hypothyroïde ratten zou HBCD willicht een mogelijk gunstig effect kunnen hebben.

In het voorgestelde experiment willen wij hypothyroïde en controle ratten (vrouwtjes) blootstellen aan een lage (3 mg/kg lichaamsgewicht) en een iets hogere (30 mg/kg) maar ruimschoots sublethale dosis HBCD gedurende een korte periode van 7 dagen. Vorig jaar hebben wij eenzelfde experiment uitgevoerd bij mannetjes. Wij hebben hierbij effecten gemeten op corticosterone (een verlagend effect) en leptine (een verlagend effect). TSH, T3 en T4 waren, in tegenstelling tot onze verwachtingen slechts veranderd in de controlegroep, en niet in de hypothyroïde groep. Omdat vrouwtjes over het algemeen veel gevoeliger zijn hopen wij na 7 dagen positieve effecten op de schildklierhormoon huishouding waar te nemen. Omdat hypothyroïde dieren gevoeliger zijn voor veranderingen in schildklierhormoon status hopen wij reeds na 7 dagen effecten te zien bij de dosis van 30 mg/kg (waar het RIVM kleine effecten begon te zien na 28 dagen bij blootstelling vanaf 30 mg/kg). Direct doel: leidt HBCD tot overstimulatie van de normale schildklierhormoonfunctie en kan het daarmee de gevolgen van hypothyroïdie herstellen? Uiteindelijk doel: wat is het onderliggende mechanisme van de (eventuele) effecten van HBCD op schildklierhormoonwerking.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diermodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoidie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

Uitbreiding maatschappelijk belang:

Hexabromocyclododecane (HBCD) is een gebromeerde vlamvertrager die gebruikt wordt in de textielindustrie en bij het vervaardigen van piepschuim. Deze vlamvertrager komt uiteindelijk via ons dieet in het lichaam en hoopt zich daar op. De laatste jaren worden ook toenemende concentraties HBCD gevonden in het menselijk lichaam. HBCD is door verschillende onderzoekers als weinig toxisch bestempeld en HBCD heeft de laatste jaren dan ook wat minder aandacht gekregen dan recent noodzakelijk bleek uit experimenten waarin gevonden is dat HBCD de schildklierwerking beïnvloed. Middels het achterhalen van het werkingsmechanisme van HBCD en kwantificeren van haar effecten pogen wij een zo goed mogelijke risico-evaluatie te maken.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 26-10-2007 tot 04-01-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	65	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreood
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten	Controle dieet, 1e generatie	
Controle vrouw 75	ratten	Controle dieet, 1e generatie	
Nieuwedosisperchloraat	15	ratten	Hypothyreood, 1e generatie, 0,05% perchloraat
HBCD 0, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 0 mg/kg HBCD
HBCD 3, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 3 mg/kg HBCD
HBCD 30, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 30 mg/kg HBCD
HBCD 0, hypo	6	ratten	Hypothyreood, 1e generatie, 0 mg/kg HBCD
HBCD 3, hypo	6	ratten	Hypothyreood, 1e generatie, 3 mg/kg HBCD
HBCD 30, hypo	6	ratten	Hypothyreood, 1e generatie, 30 mg/kg HBCD

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED].

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groepsgrootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groepsgrootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoïde dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 140 dagen) the effecten van hypothyreoïdie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Nieuwedosisperchloraat	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 0, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 3, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 30, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 0, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 3, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 30, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht en na spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

De dieren in het HBCD experiment krijgen 0,2 ml vanillevla per 100 g lichaamsgewicht per dag toegediend. (aan 0,9 ml vanillevla wordt ongeveer 100 µl maisolie met (of zonder) HBCD toegevoegd, dit is het mengsel dat aan de dieren wordt gevoerd).

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). De vaginale lavages plaatsvinden in een periode van maximaal 2 weken rondom de geplande dag van sectie van het betreffende dier (dus uiterlijk 14 vaginale lavages per rat).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 140 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd (m.u.v. dag 76 waarop geen vrouwtjes zullen worden opgeofferd). Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

Verder willen wij 15 hypothyreode vrouwtjes op een perchloraat dieet zetten waar slechts 0,05% perchloraat aan is toegevoegd aan het drinkwater. Dit is dus een factor 10 minder dan wat wij tot op heden gebruikten. Wij willen deze dosis toepassen omdat deze dosis meer in de buurt komt van wat een veelgebruikte dosis perchloraat is in humane studies. Omdat eerdere studies met een lagere dosis perchloraat (lager dan 0,05%) een wisselende mate van succes hadden wat betreft het in stand houden van de hypothyreoidie willen wij niet lager gaan dan deze dosis. Het doel is om te kijken of de dieren eenzelfde gewichtsverloop en schildklierhormoonstatus hebben als hypothyreode dieren op een dosis van 0,5%. De dieren zullen worden opgeofferd op een leeftijd van 50 dagen (7 ratten) en op een leeftijd van 100 dagen (de resterende 8 ratten). De gewichten zullen worden meerdere malen per week gemonitord, maar in ieder geval op de leeftijden van 35, 42, 50, 64, 76, 86 en 100 dagen.

In de uitbreiding van het voorgestelde experiment met HBCD blootstelling willen wij hypothyreode en controle ratten (vrouwtjes) blootstellen aan een lage (3 mg/kg lichaamsgewicht) en een iets hogere (30 mg/kg) maar ruimschoots sublethale dosis HBCD gedurende een korte periode van 7 dagen. De ratten zullen vanaf dag 79 0,2 ml vanille vla (per 100g lichaamsgewicht) met HBCD krijgen toegediend (danwel

alleen vanille vla). Uit de voorgaande proef bleek dat de ratten dit zelf snel komen opeten wanneer dit dicht bij de bek wordt aangeboden. Na 7 dagen zullen de dieren volgens het bestaande protocol worden opgeofferd. Bij deze dieren zal de schildklier, brein, gonadaal vet, visceraal vet, lever, nier, hypofyse en de gonaden worden uitgenomen ter bepaling van up-downregulatie van o.a. schildklierhormoonreceptoren.

Om bestaande te kunnen combineren met de reeds goedgekeurde dierproef zullen wij de 5 vrouwtjes per dieet die op dag 86 worden opgeofferd combineren met de 0 HBCD groep. Verder zullen wij dag 76 willen schrappen om in totaal 5 vrouwtjesdieren te besparen. In totaal hebben wij dan nog 1+1+6 dieren nodig (dus 8) per dieetgroep (hypo/controle) die nog extra zullen moeten worden opgeofferd buiten het voorheen totaal aantal aangevraagde dieren.

In totaal zijn er bij onze experimenten dit jaar veel meer vrouwtjes dan mannetjes geboren. Met de huidige uitbreiding van de proef hebben wij in totaal nog 4 controlevrouwtjes en 2 hypovrouwtjes, 4 controlemannetjes en 4 hypomannetjes over. Wij willen deze dieren als reserve aanhouden tot dag 125. Wij zullen deze dieren op dag 125 opofferen.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering
Nieuwedosisperchloraat	B. Gering/Matig
HBCD 0, controle	B. Gering/Matig
HBCD 3, controle	B. Gering/Matig
HBCD 30, controle	B. Gering/Matig
HBCD 0, hypo	B. Gering/Matig
HBCD 3, hypo	B. Gering/Matig
HBCD 30, hypo	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Regelmatig wegen (uitgezonderd de bronst controle mannen)

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes) (start maximaal twee weken rondom de geplande sectiedatum).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	D. Is wel toegepast.
Hypothyroid vrouw	D. Is wel toegepast.
Hypo moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle man	D. Is wel toegepast.

Controle vrouw D. Is wel toegepast.
 Nieuwedosisperchloraat D. Is wel toegepast.
 HBCD 0, controle D. Is wel toegepast.
 HBCD 3, controle D. Is wel toegepast.
 HBCD 30, controle D. Is wel toegepast.
 HBCD 0, hypo D. Is wel toegepast.
 HBCD 3, hypo D. Is wel toegepast.
 HBCD 30, hypo D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Hypothyroid man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Hypothyroid vrouw A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Hypo moederdieren A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Controle moederdieren A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Controle man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Controle vrouw A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Nieuwedosisperchloraat A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 0, controle A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 3, controle A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 30, controle A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 0, hypo A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 3, hypo A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 30, hypo A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man Het dier is na de proef in leven gelaten.
 Hypothyroid man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Hypothyroid vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Hypo moederdieren Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Controle moederdieren Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Controle man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Controle vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Nieuwedosisperchloraat Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 0, controle Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 3, controle Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 30, controle Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 0, hypo Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 3, hypo Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 30, hypo Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt altijd mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min) waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[Redacted names]

- student heeft cursus proefdierkunde gevolgd
 , art. 12 - student gaat cursus proefdierkunde in september volgen
 - student heeft cursus proefdierkunde gevolgd in Groningen (copy examenresultaat bij 
 ingeleverd)
 , student heeft cursus proefdierkunde gevolgd

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.h (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	65					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	75					02	4	1	1	1
Nieuwedosisperchloraat	1	02	1	15					01	4	1	2	1
HBCD 0, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 3, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 30, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 0, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 3, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 30, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, nier, schildklier, spierweefsel, darm en hersenen

Aanmeldcode / Protocol: 2007033.i

Stadia van de proef:

07-11-2007	Aangemeld	
08-11-2007	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
07-05-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042 en 2006043. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted], in de lijn van het onderzoek van [redacted] op het gebied van metabolisme, en in de nieuw op te starten lijn van onderzoek van [redacted] op het gebied van centrale en perifere regulatie van het metabolisme. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted], [redacted], [redacted] en [redacted].

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd. Het definitieve projectvoorstel op gebied van de mannelijke gonaden is door [redacted] en de begeleidingscommissie positief beoordeeld.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

In het AIO project van [redacted] en het onderzoek van [redacted] wordt de rol van hyper- en hypothyroidie op de gonadale ontwikkeling van de rat onderzocht. In eerdere experimenten is de volledige ontwikkeling onderzocht van dieren die gedurende hun hele leven mild hypothyreoïd waren. De ontwikkeling van de testis bleek te zijn vertraagd met ten minste 2 weken op niveau van de proliferatie van testosteron producerende cellen (Leydig cellen). Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoïdie op ovarium ontwikkeling is uit het laatste experiment naar voren gekomen dat in de vrouwelijke hypothyreoïde pups ondanks het lage lichaamsgewicht de leptine niveaus met een factor 2 verhoogd te zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen (zie ook onderzoek uitgevoerd door [redacted]). Het aan te vragen experiment vormt een uitbreiding van deze proef 2006046.

Leptine wordt geproduceerd door vetweefsel. In proef 2006046 is in vrouwelijke dieren het percentage totaal lichaamsvet bepaald, echter door de variatie in de uitkomsten zouden we de grootte van de groepen wat verder willen uitbreiden. Daarnaast willen we een vetbepaling in een aantal organen doen (in de vorige proef is alleen een totale lichaamsvet bepaling gedaan en zijn er geen afzonderlijke organen meegenomen). Op deze wijze hopen we een verklaring te vinden voor de bron van het leptine in onze

hypothyroïde ratten. Daarnaast willen we in de hersenen van de vrouwelijke hypothyroïde pups gaan kijken naar de expressie van leptine receptoren en hun rol in de initiatie van de puberteit in deze pups (nieuw project van [REDACTED] in samenwerking met [REDACTED]).

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder mbv RT-PCR en Western blotting in testes, ovaria, hersenen, schildklier, lever darm en nier gaan kijken naar de expressie van een aantal specifieke genen en eiwitten waarvan we het vermoeden hebben dat de expressie sterk veranderd is oiv de chronische hypothyroïdie. Op grond van de literatuur wordt hierbij oa gedacht aan de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)), de expressie van schildklierhormoon receptoren en de darmabsorptie (representatief voor veranderingen in het metabolisme). In de testis is het bijvoorbeeld nog steeds niet bekend of de Leydig cellen schildklierhormoon receptoren tot expressie brengen of schildklierhormoon dus direct een invloed op de ontwikkeling en functie van Leydig cellen kan uitoefenen. In de hersenen willen we gaan onderzoeken mbv een Golgi kleuring of de vorming en de uitgroei van neuronen in de cortex en hippocampus veranderd is oiv van chronische hypothyroïdie, en of de deling van neuronale stamcellen verhoogd is. Daarnaast willen we in de hersenen de expressie van leptine receptoren gaan onderzoeken. Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyroïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 150 dagen).

Uitbreiding direct en uiteindelijk doel: hexabromocyclododecane (HBCD) is een gebromeerde vlamvertrager die gebruikt wordt in de textielindustrie en bij het vervaardigen van piepschuim. Deze vlamvertrager komt uiteindelijk via ons dieet in het lichaam en hoopt zich daar op. De laatste jaren worden dan ook toenemende concentraties HBCD gevonden in het menselijk lichaam. HBCD is door verschillende onderzoekers als weinig toxisch bestempeld en HBCD heeft de laatste jaren dan ook wat minder aandacht gekregen dan recent noodzakelijk bleek. Vele onderzoeken hebben bij blootstelling variërend van 28 tot 90 dagen tot een dosis van 125 mg/kg lichaamsgewicht geen effecten laten zien. Recent onderzoek van het RIVM heeft laten zien dat een 28-daagse blootstelling aan HBCD in lagere doses echter wel effect heeft op verschillende fysiologische parameters in de hypofyse-schildklier-as (vanaf 30 mg/kg lichaamsgewicht). Recente studies bij de leerstoelgroep Toxicologie hebben laten zien dat HBCD in combinatie met T3 zowel in vitro, in vivo bij kikkers, als in weefselcultuur met staartjes van kikkervisjes de normale schildklierhormoonwerking sterk overstimuleerde tot meer dan het normale maximum. Bij normale dieren en mensen treedt naar verwachting geen effect op, maar in onze hypothyroïde ratten zou HBCD wellicht een mogelijk gunstig effect kunnen hebben.

In het voorgestelde experiment willen wij hypothyroïde en controle ratten (vrouwtjes) blootstellen aan een lage (3 mg/kg lichaamsgewicht) en een iets hogere (30 mg/kg) maar ruimschoots sublethale dosis HBCD gedurende een korte periode van 7 dagen. Vorig jaar hebben wij eenzelfde experiment uitgevoerd bij mannetjes. Wij hebben hierbij effecten gemeten op corticosterone (een verlagend effect) en leptine (een verlagend effect). TSH, T3 en T4 waren, in tegenstelling tot onze verwachtingen slechts veranderd in de controlegroep, en niet in de hypothyroïde groep. Omdat vrouwtjes over het algemeen veel gevoeliger zijn hopen wij na 7 dagen positieve effecten op de schildklierhormoon huishouding waar te nemen. Omdat hypothyroïde dieren gevoeliger zijn voor veranderingen in schildklierhormoon status hopen wij reeds na 7 dagen effecten te zien bij de dosis van 30 mg/kg (waar het RIVM kleine effecten begon te zien na 28 dagen bij blootstelling vanaf 30 mg/kg). Direct doel: leidt HBCD tot overstimulatie van de normale schildklierhormoonfunctie en kan het daarmee de gevolgen van hypothyroïdie herstellen? Uiteindelijk doel: wat is het onderliggende mechanisme van de (eventuele) effecten van HBCD op schildklierhormoonwerking.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Een goed functionerende schildklier is van groot belang met betrekking tot groei en ontwikkeling van (landbouw-huis-)dieren en mensen. Een tekort aan schildklierhormoon is schadelijk voor de zich ontwikkelende foetus: zowel de gonaden als de hersenen worden hierdoor verstoord in hun normale ontwikkeling en rijping. In dit project wordt aan deze problematiek aandacht besteed middels een diersmodel (rat). Het onderzoek richt zich in deze proef naast de ontwikkeling van de gonaden op latere leeftijd op de effecten van chronische hypothyreoïdie op organen zoals de darm, lever, nier, schildklier, hersenen, spier- en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

Algemeen bekend is dat bij vrouwen de hoeveelheid vet in het lichaam van groot belang is voor het tot stand komen van de eerste ovulatie. Leptine en insuline spelen hierin bijvoorbeeld een rol (zoals door dr Bert van de Heijning ook binnen ons lab is laten zien). In de vrouwtjes willen wij het effect van de voedingsstatus en vetstatus op de start van de puberteit in relatie tot metabolisme nader in kaart brengen.

Uitbreiding maatschappelijk belang:

Hexabromocyclododecane (HBCD) is een gebromeerde vlamvertrager die gebruikt wordt in de textielindustrie en bij het vervaardigen van piepschuim. Deze vlamvertrager komt uiteindelijk via ons dieet in het lichaam en hoopt zich daar op. De laatste jaren worden ook toenemende concentraties HBCD gevonden in het menselijk lichaam. HBCD is door verschillende onderzoekers als weinig toxisch bestempeld en HBCD heeft de laatste jaren dan ook wat minder aandacht gekregen dan recent noodzakelijk bleek uit experimenten waarin gevonden is dat HBCD de schildklierwerking beïnvloed. Middels het achterhalen van het werkingsmechanisme van HBCD en kwantificeren van haar effecten pogen wij een zo goed mogelijke risico-evaluatie te maken.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 12-11-2007 tot 26-12-2007

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	15	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	75	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	65	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie
Hypo moederdieren	24	ratten	Hypothyreoïd
Controle moederdieren	21	ratten	Controle dieet
Controle man 75	ratten	Controle dieet, 1e generatie	
Controle vrouw 75	ratten	Controle dieet, 1e generatie	
Nieuwedosisperchloraat	15	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie, 0,05% perchloraat
HBCD 0, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 0 mg/kg HBCD
HBCD 3, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 3 mg/kg HBCD
HBCD 30, controle	6	ratten	Controle dieet, 1e generatie, 30 mg/kg HBCD
HBCD 0, hypo	6	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie, 0 mg/kg HBCD
HBCD 3, hypo	6	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie, 3 mg/kg HBCD
HBCD 30, hypo	6	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie, 30 mg/kg HBCD

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Wistar WU ratten, betrokken bij [REDACTED]

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

In de literatuur is al veel bekend over dit soort werk met deze diersoort; onze resultaten zijn dan ook direct vergelijkbaar en interpreteerbaar. De diersoort leent zich uitstekend qua grootte en fysiologie voor dit soort experimenten. Ook het eerdere werk met dit model uitgevoerd in ons laboratorium is in ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 4-5 op ongeveer vereist voor een goede opzet van dit type experiment. Deze groepsgrootte is gebaseerd op het aantal dieren dat noodzakelijk is voor acceptatie van artikelen ter publicatie en is eveneens op basis van de statistiek de minimale groepsgrootte. Door middel van een power-analyse hebben wij de verschillen die wij belangrijk achten als uitgangspunt genomen samen met de standaarddeviatie die wij bij voorgaande experimenten hebben gevonden.

De keuze voor de verschillende leeftijdsklassen is gebaseerd op de belangrijkste dagen van de ontwikkeling van de testis (en het ovarium), het brein EN de start van de puberteit. De gekozen leeftijden zijn gebaseerd op ons eigen eerdere onderzoek en literatuurgegevens. Gezien het feit dat de ontwikkeling van de hypothyreoïde dieren op vele punten een aantal weken achter loopt op de ontwikkeling van de controle dieren, hebben wij gekozen een aantal leeftijden ook na afloop van de puberteit (64 dagen) op te nemen in dit experiment. Daarnaast willen we in een tweetal groepen (100 en 140 dagen) the effecten van hypothyreoïdie op gevorderde leeftijd bestuderen.

4.d. Herkomst:

Bronstcontrole man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypothyroid vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Hypo moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle moederdieren	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Controle vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Nieuwedosisperchloraat	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 0, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 3, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 30, controle	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 0, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 3, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
HBCD 30, hypo	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

5.a. Accommodatie:

Standaard huisvesting in Macrolon type 4 kooien (4 ratten per kooi), met houtsnippers op de bodem. Gedurende de periode van het paren/dracht en na spenen huisvesting in Macrolon type 3 kooien. Touwtje als kooiverrijking (m.u.v. laatste dag van dracht en gedurende de zoogperiode), tissue als kooiverrijking in de laatste week van de dracht, en tot aan het spenen.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Dagelijkse verzorging door kundig personeel. Dieren worden 3x per week gewogen. Voer/wateropname wordt bijgehouden (per groep, en gedurende de dracht per dier). Gewichtsafname van meer dan 15% (uitgezonderd bij het werpen) is een indicatie voor het vroegtijdig opofferen van het dier, evenals het niet eten of drinken gedurende een periode van meer dan 1 dag.

5.c. Voeding:

Voederbrokken en drinkwater zijn ad libitum beschikbaar. De dieren ontvangen voer dat jodide arm is (voer op basis van caseïne volgens de richtlijnen van het AIN), voor de controle groep is er weer jodide aan toegevoegd tot de standaard AIN hoeveelheden. Om dieren hypothyreoïd te maken is bij de hypothyreoïde groep het drinkwater verrijkt met 0,5% perchloraat. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan. De dieren in het HBCD experiment krijgen 0,2 ml vanillevla per 100 g lichaamsgewicht per dag toegediend. (aan 0,9 ml vanillevla wordt ongeveer 100 µl maisolie met (of zonder) HBCD toegevoegd, dit is het mengsel dat aan de dieren wordt gevoerd).

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 45 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 15 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 24 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 21 vrouwtjes zullen een controle dieet ontvangen dat een voldoende hoeveelheid jodide bezit gelijk aan de normen van het AIN. Vrouwtjes zullen solitair gehuisvest worden en eveneens zal een start gemaakt worden met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). 2 weken na de start van het dieet worden alle vrouwtjes gedekt (1 man + 1 vrouw overnacht in een kooi). Alle vrouwtjes dienen binnen 2 weken na de start van het drachtig maken gedekt te zijn.

Na het werpen zullen de nakomelingen worden gespeend op een leeftijd van 28 dagen. (Nestgrootte wordt teruggebracht naar maximaal 12 dieren per nest op een leeftijd van 2 dagen). De dieren blijven op het controle dieet, danwel op het jodide-arme dieet waaraan perchloraat is toegevoegd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 12, 16, en 21 dagen zullen 10 vrouwtjes en 10 mannetjes per dieet worden opgeofferd. Van 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per dieet per leeftijd zullen de gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, spier, darm en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere Immunohistologische en moleculaire analyse. Van de 5 resterende vrouwtjes en mannetjes zal een totaal vet/eiwit bepaling worden gedaan (hiervoor moeten de dieren intact blijven ter uitbreiding van de reeds beschikbare data). Dagelijks zullen de vrouwtjes op vaginale opening worden gecontroleerd. Vanaf 4 dagen na vaginale opening zal worden gestart met het nemen van vaginale lavages (6 uur na start van de lichtperiode). De vaginale lavages plaatsvinden in een periode van maximaal 2 weken rondom de geplande dag van sectie van het betreffende dier (dus uiterlijk 14 vaginale lavages per rat).

Op een leeftijd van 28, 35, 42, 50, 64, 76, 86, 100 en 140 dagen zullen 5 vrouwtjes en 5 mannetjes per leeftijd per dieet worden opgeofferd (m.u.v. dag 76 waarop geen vrouwtjes zullen worden opgeofferd). Deze dieren zullen worden gebruikt in onderzoek naar de expressie van genen en eiwitten in de gonaden, nier, lever, hersenen, schildklier, spier- darm- en vetweefsel onderzocht worden. Daarnaast zal er in de hersenen gekeken worden naar de expressie van leptine receptoren en de delingsactiviteit van neuronale stamcellen.

Bij alle proefdieren zal worden gemeten: gewicht (lichaam en organen), dag van oog opening, dag van vaginale opening, luteinizing hormone, thyroid stimulerend hormoon, tri-iodothyronine, thyroxine, follicle stimulating hormone, testosterone (bij mannetjes), prolactine (bij vrouwtjes), groeihormoon, leptine, insuline en corticosterone.

Verder willen wij 15 hypothyreode vrouwtjes op een perchloraat dieet zetten waar slechts 0,05% perchloraat aan is toegevoegd aan het drinkwater. Dit is dus een factor 10 minder dan wat wij tot op heden gebruikten. Wij willen deze dosis toepassen omdat deze dosis meer in de buurt komt van wat een veelgebruikte dosis perchloraat is in humane studies. Omdat eerdere studies met een lagere dosis perchloraat (lager dan 0,05%) een wisselende mate van succes hadden wat betreft het in stand houden van de hypothyreoidie willen wij niet lager gaan dan deze dosis. Het doel is om te kijken of de dieren eenzelfde gewichtsverloop en schildklierhormoonstatus hebben als hypothyreode dieren op een dosis van 0,5%. De dieren zullen worden opgeofferd op een leeftijd van 50 dagen (7 ratten) en op een leeftijd van 100 dagen (de resterende 8 ratten). De gewichten zullen worden meerdere malen per week gemonitord, maar in ieder geval op de leeftijden van 35, 42, 50, 64, 76, 86 en 100 dagen.

In de uitbreiding van het voorgestelde experiment met HBCD blootstelling willen wij hypothyreode en controle ratten (vrouwtjes) blootstellen aan een lage (3 mg/kg lichaamsgewicht) en een iets hogere (30 mg/kg) maar ruimschoots sublethale dosis HBCD gedurende een korte periode van 7 dagen. De ratten zullen vanaf dag 79 0,2 ml vanille vla (per 100g lichaamsgewicht) met HBCD krijgen toegediend (danwel

alleen vanille vla). Uit de voorgaande proef bleek dat de ratten dit zelf snel komen opeten wanneer dit dicht bij de bek wordt aangeboden. Na 7 dagen zullen de dieren volgens het bestaande protocol worden opgeofferd. Bij deze dieren zal de schildklier, brein, gonadaal vet, visceraal vet, lever, nier, hypofyse en de gonaden worden uitgenomen ter bepaling van up-downregulatie van o.a. schildklierhormoonreceptoren.

Om bestaande te kunnen combineren met de reeds goedgekeurde dierproef zullen wij de 5 vrouwtjes per dieet die op dag 100 worden opgeofferd combineren met de 0 HBCD groep. Verder zullen wij dag 76 willen schrappen om in totaal 5 vrouwtjesdieren te besparen. In totaal hebben wij dan nog 1+1+6 dieren nodig (dus 8) per dieetgroep (hypo/controle) die nog extra zullen moeten worden opgeofferd buiten het voorheen totaal aantal aangevraagde dieren.

In totaal zijn er bij onze experimenten dit jaar veel meer vrouwtjes dan mannetjes geboren. Met de huidige uitbreiding van de proef hebben wij in totaal nog 2 hypovrouwtjes, 4 controlemannetjes en 4 hypomannetjes over. Wij willen deze dieren als reserve aanhouden tot dag 125. Wij zullen deze dieren op dag 125 opofferen.

6.b. Mate van ongerief:

Bronstcontrole man	A. Gering
Hypothyroid man	B. Gering/Matig
Hypothyroid vrouw	B. Gering/Matig
Hypo moederdieren	B. Gering/Matig
Controle moederdieren	A. Gering
Controle man	B. Gering/Matig
Controle vrouw	A. Gering
Nieuwedosisperchloraat	B. Gering/Matig
HBCD 0, controle	B. Gering/Matig
HBCD 3, controle	B. Gering/Matig
HBCD 30, controle	B. Gering/Matig
HBCD 0, hypo	B. Gering/Matig
HBCD 3, hypo	B. Gering/Matig
HBCD 30, hypo	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Regelmatig wegen (uitgezonderd de bronst controle mannen)

Solitaire huisvesting gedurende de dracht.

Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes) (start maximaal twee weken rondom de geplande sectiedatum).

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren.

Narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Bronstcontrole man	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Hypothyroid man	D. Is wel toegepast.
Hypothyroid vrouw	D. Is wel toegepast.
Hypo moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle moederdieren	D. Is wel toegepast.
Controle man	D. Is wel toegepast.

Controle vrouw D. Is wel toegepast.
 Nieuwedosisperchloraat D. Is wel toegepast.
 HBCD 0, controle D. Is wel toegepast.
 HBCD 3, controle D. Is wel toegepast.
 HBCD 30, controle D. Is wel toegepast.
 HBCD 0, hypo D. Is wel toegepast.
 HBCD 3, hypo D. Is wel toegepast.
 HBCD 30, hypo D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

Bronstcontrole man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Hypothyroid man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Hypothyroid vrouw A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Hypo moederdieren A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Controle moederdieren A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Controle man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Controle vrouw A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Nieuwedosisperchloraat A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 0, controle A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 3, controle A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 30, controle A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 0, hypo A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 3, hypo A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 HBCD 30, hypo A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Kooiverrijking, verzorging en behandeling door ervaren diervverzorgers.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Bronstcontrole man Het dier is na de proef in leven gelaten.
 Hypothyroid man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Hypothyroid vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Hypo moederdieren Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Controle moederdieren Het dier is gedood na het einde van de proef.
 Controle man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Controle vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Nieuwedosisperchloraat Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 0, controle Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 3, controle Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 30, controle Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 0, hypo Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 3, hypo Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 HBCD 30, hypo Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De proefdieren worden na de proef gedood ter evaluatie van de aangegeven organen, danwel voor een bepaling van de totale hoeveelheid vet/eiwit in het lichaam. Euthanasie gebeurt mbv CO₂/O₂-inhalatie (flow 2l/min vs 1l/min) waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgeknipt en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie. Echter bij dieren van 12 dagen oud wordt gekozen voor opoffering middels decapitatie (zonder voorafgaande anesthesie).

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Dit project noodzaakt gezien de doelen het gebruik van het gehele en intacte dier. Helaas is er nog geen in-vitro model beschikbaar.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

- student heeft cursus proefdierkunde gevolgd
 art. 12 - student gaat cursus proefdierkunde in september volgen
 - student heeft cursus proefdierkunde gevolgd in Groningen (copy examenresultaat bij
 ingeleverd)
 , student heeft cursus proefdierkunde gevolgd

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2007033.i (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	15					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	65					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	24					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	21					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	75					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	75					02	4	1	1	1
Nieuwedosisperchloraat	1	02	1	15					01	4	1	2	1
HBCD 0, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 3, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 30, controle	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 0, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 3, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1
HBCD 30, hypo	1	02	1	6					01	4	1	2	1

Uw aanvraag 2007033.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is niet tot een advies gekomen, aangezien de context van de proef haar niet duidelijk is, mede gezien het grote aantal experimenten dat in het verleden al is uitgevoerd. De DEC is van mening dat het doel van de proef niet opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan, aangezien de toegevoegde waarde van de proef haar niet duidelijk wordt op basis van het voorliggende proefplan.

De DEC verzoekt u aan te geven, tot welke resultaten voorgaande proeven hebben geleid (publicaties) en welke leemten nog dienen te worden opgevuld met voorgenomen dierproef. Na verduidelijking van voorgaande vragen kan het proefplan opnieuw worden ingediend voor de vergadering van 16 april a.s. De DEC onderschrijft het belang van de proef, maar heeft bij de opzet een aantal vragen en opmerkingen waarop ze een antwoord wil alvorens een definitief advies te geven. Het gaat om de volgende vragen en opmerkingen:

De DEC verzoekt u bij 4.c. het aantal dieren beter te beargumenteren (i.h.b. een betere onderbouwing van alle tijdstippen) en dit in overeenstemming te brengen met de aantallen, die genoemd worden bij 6.a., aangezien daar andere aantallen staan. Tevens verzoekt de DEC u ervoor zorg te dragen, dat de pups, die wel worden geboren, maar niet in de proef worden gebruikt achteraf geregistreerd worden (naregistatie).

Bovendien verzoekt de DEC u bij 6.c. (bronnen van ongerief) de bloedafname en het doden van de dieren toe te voegen.

Uw antwoorden zullen door het klein comité worden besproken en afgehandeld.

Uw aanvraag 2007033.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Dit om de doorgesproken zaken te wijzigen. Na aanmelding zal de proef door de proefdierdeskundige worden behandeld.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[Redacted Signature]

Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.e, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[Redacted Signature]

Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.e, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Dit om de wijziging door te voeren zoals die zojuist besproken is. Na aanmelding zal de proef door de proefdierdeskundige afgehandeld worden.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[Redacted Signature]

Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.f, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Het betreft een amendement op 2007033.e, dat is afgehandeld door de proefdierdeskundige. Zeven dieren van de groep die het dieet met een lagere perchlooraat concentratie krijgen worden nu op dag 50 geëuthanaseerd in plaats van op dag 100.

Met vriendelijke groet,

[Redacted Signature]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2007033.f, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Dit om een extra experiment in te voegen, welke door de DEC zal worden behandeld.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Proefdierdeskundige

De DEC is op basis van het voorliggende proefplan nog niet tot een afweging gekomen aangezien zij enkele vragen heeft bij de door u geschetste doel- en vraagstelling. Daarnaast is er nog een aantal vragen m.b.t. de uitvoering van de proef, die beantwoord moeten worden alvorens de proef te kunnen beoordelen. Na beantwoording van de vragen, zal de proef door de voltallige DEC opnieuw worden beoordeeld. I.v.m. de tijdsdruk zal de bespreking middels e-mail plaatsvinden.

Bij 1.a. (te beantwoorden vraag) haalt u een studie aan (van de Ven et al. (2006)). Deze studie laat een verhoogd schildkliergewicht zien en een verlaagd T4-gehalte t.g.v. de blootstelling aan HBCD. Dat lijkt dus dezelfde kant op te werken als een te lage joodstatus. De DEC verzoekt u te beargumenteren, waarom u in tegenstelling tot deze studie juist een tegengesteld "gunstig" effect verwacht. De DEC kan zich wel voorstellen, dat het voor zinvol is te onderzoeken, of HBCD juist voor mensen met een te lage joodinname een verhoogd risico met zich meebrengt.

Daarnaast geeft u aan, dat het doel is het onderliggende mechanisme van de effecten van HBCD te onderzoeken. Dit komt niet tot uitdrukking in de proefopzet, aangezien deze zich naar het oordeel van de DEC uitsluitend richt op het bepalen van het effect.

Bovendien verzoekt de DEC u te beargumenteren, waarom er nu wordt uitgegaan van blootstelling gedurende slechts 7 dagen, waardoor de effecten mogelijk niet zichtbaar worden, mede gezien het feit, dat bij de eerder genoemde studie de dieren gedurende 28 dagen werden behandeld. Tevens verzoekt de DEC u duidelijker de keuze voor een dosering van 3 mg/ kg te beargumenteren.

Tevens verzoekt de DEC u aan te geven, met welk type HBCD de dieren worden behandeld, aangezien HBCD een technisch mengsel is, bestaande uit meerdere congenen (worden de dieren behandeld met dit technische mengsel of 1 van de congenen?).

Daarnaast geeft de DEC u in overweging om, afhankelijk van de uitkomst ook de interne dosis (HBCD-gehalten in organen) te bepalen.

Bovendien verzoekt de DEC u aan te geven, of de controledieren ook middels vla worden gevoed met eventueel het oplosmiddel, aangezien ze uit de andere subproef afkomstig zijn.

Tenslotte heeft de DEC nog enkele redactionele opmerkingen.

De commissie verzoekt u aan te geven hoe vaak de vaginale lavages plaatsvinden.

Tevens verzoekt de DEC u de vakgroep  toe te voegen aan de lijst van betrokken partijen (Toelichting boven 1.a.).

Tenslotte verzoekt de DEC u aan te geven, hoe de pups zullen worden geëuthanaseerd.

Zoals boven reeds aangegeven zullen uw antwoorden door de voltallige DEC opnieuw worden beoordeeld.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.h, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies verzoekt de DEC u een onderscheid te maken tussen de de pups en de volwassen dieren wat betreft de dodingsmethoden: de volwassen dieren kunnen met CO2/O2 geëuthanaseerd worden, voor jonge pups is dit niet de eerste keus van euthanasie. De DEC adviseert u ze te decapiteren.

Na wijziging zal de proef door de secretaris van de DEC worden afgehandeld.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,



Secretaris DEC

Uw aanvraag 2007033.i, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,



Secretaris DEC