

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effect van voorbijgaande en chronische hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, en schildklier

Aanmeldcode / Protocol: 2008048.a

Stadia van de proef:

07-05-2008	Aangemeld	
20-05-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
21-05-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042, 2006043 en 2007033. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het vervolg op het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], mede in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted]. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted]

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd.

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 schildklierhormoon 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). Daarnaast hebben we uit het vorige experiment aanwijzingen gevonden dat de expressie van de androgeen receptor in de Sertoli cellen vertraagd is. Binding van androgenen aan deze receptor is van essentieel belang voor de ontwikkeling van de testis. Om deze waarneming verder te onderzoeken op zowel eiwit als gen niveau is nieuw testis materiaal noodzakelijk.

Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoidie 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 zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen. Onze huidige inzichten in de ontwikkeling van het ovarium zijn echter nog beperkt. Wij willen daarom op verschillende (jonge) leeftijden naar de epigenetica kijken van deze dieren kijken. Ook willen wij juist ook op latere leeftijd kijken of de trends in de verschillen die wij vinden zich voortzetten.

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder 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. In vorige experimenten hebben wij ons gefocust op de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)). Wij willen ons nu meer focuseren op de expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor. 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. Daarnaast willen we onderzoeken wanneer de androgeen receptor tot expressie komt in de Sertoli cellen en wat hiervan de gevolgen zijn voor spermatogenese.

Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen. Eveneens zullen wij een vergelijk willen maken met de afgelopen aanvragen beschreven methode om hypothyreoidie te induceren bij ratten in het Leydig cel onderzoek en de in veel studies gebruikte goitrogeen propyl thiouracyl (PTU). Een aantal resultaten uit de PTU studies hebben wij met het door ons gebruikte dieet in combinatie met perchloraat niet kunnen herhalen, waarschijnlijk doordat PTU eveneens directe effecten heeft op Leydig cel functie en mogelijk ook ontwikkeling. Door nu ons onderzoek met PTU studies uit te breiden kunnen we een direct vergelijk maken met ons (meer fysiologische) model. Daartoe zullen een aantal extra leeftijdsgroepen worden toegevoegd als uitbreiding op een voorgaand experiment waarbij de hypothyreoidie teniet werd gedaan op dag 28 na geboorte.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 120 dagen).

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 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, schildklier, hersenen en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

1.c. Leksamenvatting:

2. Gepland vanaf: 25-06-2008 tot 04-12-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	25	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	60	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	60	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypo moederdieren	36	ratten	Hypothyreood
Controle moederdieren	14	ratten	Controle dieet
Controle man	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Hypo moederdieren	1e generatie	20 ratten	Hypothyreood, 1e generatie, paring en dracht
Transient day 14, man	20	ratten	Hypothyreood, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 28, man	21	ratten	Hypothyreood, op dag 28 naar controle dieet

PTU continued, man	15	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie
Transient PTU day 28, man	40	ratten	PTU vanaf geboorte tot dag 28
Transient day 14, vrouw	20	ratten	Hypothyreoïd, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 14, moeders	5	ratten	Hypothyreoïd, op dag 14 van worp naar controle dieet
PTU moeders	11	ratten	PTU vanaf worp, sectie dag 28
PTU continued, vrouw	55	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie (dag 28)
nakomelingen 2e generatie	30	ratten	Hypothyreoïd, 2e 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 (en andere) laboratorium is in Wistar ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 5 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 120 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
Hypo moederdieren 1e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient PTU day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
nakomelingen 2e generatie	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 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, of met 0.1% propyl thiouracil. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 66 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 25 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 41 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 25 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 dekken drachtig te zijn (op basis van sperma resten in de vaginale lavage). Wanneer dit niet het geval is zal het vrouwtje worden afgevoerd. Na het vinden van spermaresten in de vaginale lavage zal worden gestopt met het nemen van uitstrijkjes.

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.

Op de dag van werpen zullen 11 moeders overgaan van een controle dieet naar een controle dieet met 0.1% propylthiouracil (PTU) in het drinkwater. PTU wordt gebruikt als medicament tegen hyperthyreoïdie en in een euthyreoïde status induceert het hypothyreoïdie. Eerdere studies op het gebied van de Leydig cel ontwikkeling gebruikten PTU om hypothyreoïdie te induceren. Dat heeft geleid tot resultaten die wij met ons dieet in combinatie met perchloraat niet konden herhalen, waarschijnlijk door de directe effecten van PTU op de Leydig cel. Wij breiden nu deze voorgaande studies uit, en maken zo direct een vergelijking met ons (meer fysiologische) model. Op dag 16, 21 en 28 zullen 5 dieren worden opgeofferd. Alle vrouwtjes zullen op dag 28 worden opgeofferd.

Het PTU dieet zal op dag 28 worden stopgezet, en de nakomelingen gaan terug naar het controle dieet. Op dag 35, 42, 50, 63, 76, 86, 100 en 120 zullen 5 dieren per leeftijd worden opgeofferd.

5 moederdieren met hun pups zullen overgaan van het hypothyreoïde dieet naar een controle dieet op dag 14 postpartum. De pups worden op dag 28 gespeend, de moeders worden op dezelfde dag afgevoerd. De mannelijke nakomelingen zullen op dag 64, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep). De 20 vrouwelijke nakomelingen zullen op de dag van spenen worden afgevoerd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 7, 9, 12, 16 en 21 dagen zullen 8 vrouwtjes en 8 mannetjes van het hypothyreoide danwel controle dieet worden opgeofferd. Op dag 100 en 120 zullen 10 ratten per geslacht worden opgeofferd (hypothyreoide mannen worden hergebruikt na paring met hypothyreoide vrouwtjes - zie hier onder).

Op een leeftijd van 28 dagen zullen 41 mannen worden overgezet van een hypothyreoid dieet naar het controle dieet. Deze dieren zullen op dag 76, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep, 1 reserve dier)

20 hypothyreoide vrouwtjes zullen worden aangehouden tot een leeftijd van 9 weken waarop wordt gestart met het nemen van vaginale lavages. In week 11 zullen hypothyreoide mannen bij de vrouwtjes worden gezet en zal worden gekeken of deze eerste generatie vrouwtjes in staat is om drachtig te worden. De eventuele nakomelingen zullen tot dag 28 worden gevolgd. Op basis van eerdere experimenten verwachten wij ongeveer 5 nesten met een gemiddelde nestgrootte van 6 dieren. Hieruit komen dus ongeveer 30 dieren voort. Deze dieren worden op dag 28 afgevoerd.

Uit alle dieren zullen gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere immunohistologische en moleculaire analyse. 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, vrij T4, vrij T3, vrij testosterone en corticosteron.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	B. Gering/Matig
Transient day 14, man	B. Gering/Matig
Transient day 28, man	B. Gering/Matig
PTU continued, man	C. Matig
Transient PTU day 28, man	C. Matig
Transient day 14, vrouw	A. Gering
Transient day 14, moeders	B. Gering/Matig
PTU moeders	B. Gering/Matig
PTU continued, vrouw	C. Matig
nakomelingen 2e generatie	C. 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.

Injectie met Bromodeoxyuridine van de mannen 2 uur voorafgaande aan de sectie

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

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoide 1e generatie dieren en mogelijk 2e 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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 28, man | D. Is wel toegepast. |
| PTU continued, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient PTU day 28, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, vrouw | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, moeders | D. Is wel toegepast. |
| PTU moeders | D. Is wel toegepast. |
| PTU continued, vrouw | D. Is wel toegepast. |
| nakomelingen 2e generatie | 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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 28, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU continued, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient PTU day 28, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, vrouw | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, moeders | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU moeders | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU continued, vrouw | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| nakomelingen 2e generatie | 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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |
| Transient day 14, man | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |
| Transient day 28, man | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |
| PTU continued, man | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |
| Transient PTU day 28, man | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |

Transient day 14, vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Transient day 14, moeders Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 PTU moeders Het dier is gedood na het einde van de proef.
 PTU continued, vrouw Het dier is gedood na het einde van de proef.
 nakomelingen 2e generatie 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 die een goede beschrijving kan geven van (voorbijgaande) hypothyreoïdie op de verschillende orgaansystemen in het lichaam, en belangrijker nog, de interactie tussen deze organen.

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



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008048.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	25					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	36					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	14					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	60					01	4	1	1	1
Hypo moederdieren 1e generatie	1	02	1	20					01	4	1	2	1
Transient day 14, man	1	02	1	20					01	4	1	2	1
Transient day 28, man	1	02	1	21					01	4	1	2	1
PTU continued, man	1	02	1	15					01	4	1	3	1
Transient PTU day 28, man	1	02	1	40					01	4	1	3	1
Transient day 14, vrouw	1	02	1	20					01	4	1	1	1
Transient day 14, moeders	1	02	1	5					01	4	1	2	1
PTU moeders	1	02	1	11					01	4	1	2	2
PTU continued, vrouw	1	02	1	55					01	4	1	3	2
nakomelingen 2e generatie	1	02	1	30					01	4	1	3	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effect van voorbijgaande en chronische hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, en schildklier

Aanmeldcode / Protocol: 2008048.b

Stadia van de proef:

22-05-2008	Aangemeld	
26-05-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
26-05-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042, 2006043 en 2007033. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het vervolg op het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van Eddy Rijntjes, mede in het kader van het voortgaande onderzoek van . Buiten het wordt binnen dit project samengewerkt met

. De staf van heeft dit project besproken en goedgekeurd.

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

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

In het AIO project van en het onderzoek van wordt de rol van schildklierhormoon 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). Daarnaast hebben we uit het vorige experiment aanwijzingen gevonden dat de expressie van de androgeen receptor in de Sertoli cellen vertraagd is. Binding van androgenen aan deze receptor is van essentieel belang voor de ontwikkeling van de testis. Om deze waarneming verder te onderzoeken op zowel eiwit als gen niveau is nieuw testis materiaal noodzakelijk.

Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoidie 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 zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen. Onze huidige inzichten in de ontwikkeling van het ovarium zijn echter nog beperkt. Wij willen daarom op verschillende (jonge) leeftijden naar de epigenetica kijken van deze dieren kijken. Ook willen wij juist ook op latere leeftijd kijken of de trends in de verschillen die wij vinden zich voortzetten.

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder 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 hypothyreoïdie. In vorige experimenten hebben wij ons gefocust op de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)). Wij willen ons nu meer focussen op de expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor. 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. Daarnaast willen we onderzoeken wanneer de androgeen receptor tot expressie komt in de Sertoli cellen en wat hiervan de gevolgen zijn voor spermatogenese.

Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen. Eveneens zullen wij een vergelijk willen maken met de afgelopen aanvragen beschreven methode om hypothyreoïdie te induceren bij ratten in het Leydig cel onderzoek en de in veel studies gebruikte goitrogeen propyl thiouracyl (PTU). Een aantal resultaten uit de PTU studies van anderen, hebben wij met het door ons gebruikte dieet in combinatie met perchloraat niet kunnen herhalen, waarschijnlijk doordat PTU eveneens directe effecten heeft op Leydig cel functie en mogelijk ook ontwikkeling. Voorgaand onderzoek (uitgevoerd door anderen) beschrijft de schildklierhormoon status slecht tot niet, waardoor interpretatie van deze resultaten zeer lastig is. Eveneens zijn er binnen het Leydig cel onderzoek twee lijnen, een lijn beweert wel Leydig cellen te zien ontwikkelen, waar de andere lijn beweert geen Leydig cel tot ontwikkeling te zien komen. Door nu ons onderzoek met PTU studies uit te breiden kunnen we een direct vergelijk maken met ons (meer fysiologische) model.

Daartoe zullen een aantal extra leeftijdsgroepen worden toegevoegd als uitbreiding op een voorgaand experiment waarbij de hypothyreoïdie teniet werd gedaan op dag 28 na geboorte.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 120 dagen).

Concreet doel experimenten met

*hypothyreoïde vrouwtjes: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor, de ontwikkeling van de follikel voorraad en de versnelde afname daarvan

*hypothyreoïdie vrouwtjes op latere leeftijd: depletie van follikel voorraad, verminderde ovulatiecapaciteit van het ovarium wat uit pilot-experimenten een grotere invloed leek te hebben dan de depletie van de follikel voorraad, mogelijkheid tot voortplanting

+chronische hypothyreoïdie in mannen: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor tijdens de ontwikkeling van de testis, en de gevolgen voor het verloop van de spermatogenese

+transient hypothyreoïde mannen: zie chronisch hypothyreoïde mannen, plus uitbreiding voorgaand experiment tot een leeftijd van 120 dagen (voorgaand experiment liep tot 77 dagen postpartum en gaf een opvallend herstel in Leydig cel ontwikkeling en testis gewicht tot controle niveaus. Deze ontwikkeling zou zich echter kunnen doorzetten wat zou kunnen leiden tot absolute macro-orchie).

+PTU mannen: zie chronische hypothyreoïdie, ontwikkeling van de Leydig cel op jonge leeftijd heeft extra aandacht omdat andere PTU studies geen ontwikkeling van Leydig cellen hebben waargenomen ten tijde van de PTU toediening (tot dag 28 postpartum) waar wij dit in ons model wel hebben waargenomen. Deze groepen rapporteerden echter wel een vergrootte populatie Leydig cellen op latere leeftijd (ver na het stoppen van de PTU toedieningen).

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 diemodel (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 lever, nier, schildklier,

hersenen en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 04-06-2008 tot 04-12-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	25	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	60	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	60	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypo moederdieren	30	ratten	Hypothyreood
Controle moederdieren	15	ratten	Controle dieet
Controle man	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Hypo moederdieren 1e generatie	20	ratten	Hypothyreood, 1e generatie,
paring en dracht			
Transient day 14, man	20	ratten	Hypothyreood, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 28, man	21	ratten	Hypothyreood, op dag 28 naar controle dieet
PTU continued, man	15	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie
Transient PTU day 28, man	40	ratten	PTU vanaf geboorte tot dag 28
Transient day 14, vrouw	20	ratten	Hypothyreood, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 14, moeders	5	ratten	Hypothyreood, op dag 14 van worp naar
controle dieet			
PTU moeders	11	ratten	PTU vanaf worp, sectie dag 28
PTU continued, vrouw	55	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie (dag 28)
nakomelingen 2e generatie	30	ratten	Hypothyreood, 2e generatie
Mogelijk surplus hypothyreoidie	19	ratten	Hypothyreood, 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 (en andere) laboratorium is in Wistar ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groeps groottes van 5 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 leeftijds klassen 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 120 dagen) the effecten van hypothyreoïdie op gevorderde leeftijd bestuderen.

*Bij het PTU experiment is gekozen voor 11 moeders. Deze zullen zo'n 10 nakomelingen per nest geven.

55 vrouwtjes (sectie dag 28) en 55 mannetjes welke worden opgesplitst in 40 dieren die na dag 28 over zullen gaan op een controle dieet, en 15 dieren die voor dag 28 zullen worden opgeofferd.

*Bij de transient dag 14 dieren is gekozen voor 5 moeders (het minimum voor 5 onafhankelijke statistische eenheden) die gemiddeld 10 nakomelingen geven waarvan wij in totaal 8 dieren zullen gebruiken per moeder (dus 20 mannen en 20 vrouwen). Voor dag 14 zijn deze dieren dus hypothyreoïd en kunnen de resterende dieren onder de chronische hypothyreoïde dieren vallen.

*Bij de euthyreoïde controle moeders is gekozen voor 15 dieren. Deze dieren zullen waarschijnlijk niet allen drachtig worden binnen de gestelde termijn (dit is overigens ook bij de PTU moeders het geval, maar die worden middels deze groep gecorrigeerd). Op basis voor onze voorgaande experimenten komen wij dan op gemiddeld 120 nakomelingen (60 mannen en 60 vrouwen).

*Van de hypothyreoïde moederdieren zullen de nakomelingen worden verdeeld onder de transient dag 28 groep, en de chronisch hypothyreoïde groep dieren. Wij gebruiken 25 moederdieren. Van deze moederdieren zal ongeveer 80% binnen de gestelde termijn drachtig worden. De nestgrootte van deze dieren is echter iets lager dan bij de controle dieren waardoor wij ongeveer 180 nakomelingen verwachten. De surplus dieren zullen worden afgevoerd tot een aantal van 81 mannelijke en 80 vrouwelijke nakomelingen resteerd.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient PTU day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
nakomelingen 2e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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, of met 0.1% propyl thiouracyl. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 66 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 25 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 4 gehuisvest (mannetjes 3-4). Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 41 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 25 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 dekken drachtig te zijn (op basis van sperma resten in de vaginale lavage). Wanneer dit niet het geval is zal het vrouwtje worden afgevoerd. Na het vinden van spermaresten in de vaginale lavage zal worden gestopt met het nemen van uitstrijkjes.

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.

Op de dag van werpen zullen 11 moeders overgaan van een controle dieet naar een controle dieet met 0.1% propylthiouracil (PTU) in het drinkwater. PTU wordt gebruikt als medicament tegen hyperthyreoïdie en in een euthyreoïde status induceert het hypothyreoïdie. Eerdere studies op het gebied van de Leydig cel ontwikkeling gebruikten PTU om hypothyreoïdie te induceren. Dat heeft geleid tot resultaten die wij met ons dieet in combinatie met perchloraat niet konden herhalen, waarschijnlijk door de directe effecten van PTU op de Leydig cel. Wij breiden nu deze voorgaande studies uit, en maken zo direct een vergelijking met ons (meer fysiologische) model. Op dag 16, 21 en 28 zullen 5 dieren worden opgeofferd. Alle vrouwtjes zullen op dag 28 worden opgeofferd.

Het PTU dieet zal op dag 28 worden stopgezet, en de nakomelingen gaan terug naar het controle dieet. Op dag 35, 42, 50, 63, 76, 86, 100 en 120 zullen 5 dieren per leeftijd worden opgeofferd.

5 moederdieren met hun pups zullen overgaan van het hypothyreoïde dieet naar een controle dieet op dag 14 postpartum. De pups worden op dag 28 gespeend, de moeders worden op dezelfde dag afgevoerd. De mannelijke nakomelingen zullen op dag 64, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep). De 20 vrouwelijke nakomelingen zullen op de dag van spenen worden afgevoerd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 7, 9, 12, 16 en 21 dagen zullen 8 vrouwtjes en 8 mannetjes van het hypothyreoïde danwel controle dieet worden opgeofferd. Op dag 100 en 120 zullen 10 ratten per geslacht worden opgeofferd (hypothyreoïde mannen worden hergebruikt na paring met hypothyreoïde vrouwtjes - zie hier onder).

Op een leeftijd van 28 dagen zullen 21 mannen worden overgezet van een hypothyreoïd dieet naar het

controle dieet. Deze dieren zullen op dag 76, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep, 1 reserve dier)

20 hypothyreoide vrouwtjes zullen worden aangehouden tot een leeftijd van 9 weken waarop wordt gestart met het nemen van vaginale lavages. In week 11 zullen hypothyreoide mannen bij de vrouwtjes worden gezet en zal worden gekeken of deze eerste generatie vrouwtjes in staat is om drachtig te worden. De eventuele nakomelingen zullen tot dag 28 worden gevolgd. Op basis van eerdere experimenten verwachten wij ongeveer 5 nesten met een gemiddelde nestgrootte van 6 dieren. Hieruit komen dus ongeveer 30 dieren voort. Deze dieren worden op dag 28 afgevoerd.

Alle mannelijke dieren krijgen een injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU; 150 mg/kg lichaamsgewicht in fysiologisch zout) 2 uur voordat ze worden opgeofferd. BrdU is een thymidine analoog die ingebouwd wordt in het DNA van cellen in de S-fase van de celcyclus en als zodanig een marker voor de delingsactiviteit van cellen.

Uit alle dieren zullen gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere immunohistologische en moleculaire analyse. 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, vrij T4, vrij T3, vrij testosterone en corticosteron.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	B. Gering/Matig
Transient day 14, man	B. Gering/Matig
Transient day 28, man	B. Gering/Matig
PTU continued, man	C. Matig
Transient PTU day 28, man	C. Matig
Transient day 14, vrouw	A. Gering
Transient day 14, moeders	B. Gering/Matig
PTU moeders	B. Gering/Matig
PTU continued, vrouw	C. Matig
nakomelingen 2e generatie	C. Matig
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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.

Injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU) van de mannen 2 uur voorafgaande aan de sectie.
Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes)

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren en mogelijk 2e generatie dieren.

Voor dieren van 16 dagen en ouder geldt: 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. Dieren tot een leeftijd van 12 dagen worden zonder voorafgaande narcose gedecapiteerd.

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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 28, man | D. Is wel toegepast. |
| PTU continued, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient PTU day 28, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, vrouw | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, moeders | D. Is wel toegepast. |
| PTU moeders | D. Is wel toegepast. |
| PTU continued, vrouw | D. Is wel toegepast. |
| nakomelingen 2e generatie | D. Is wel toegepast. |
| Mogelijk surplus hypothyreoïdie | 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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 28, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU continued, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient PTU day 28, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, vrouw | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, moeders | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU moeders | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU continued, vrouw | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| nakomelingen 2e generatie | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Mogelijk surplus hypothyreoïdie | 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.
 Hypo moederdieren 1e generatie Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Transient day 14, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Transient day 28, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 PTU continued, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Transient PTU day 28, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Transient day 14, vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Transient day 14, moeders Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 PTU moeders Het dier is gedood na het einde van de proef.
 PTU continued, vrouw Het dier is gedood na het einde van de proef.
 nakomelingen 2e generatie Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Mogelijk surplus hypothyreoïdie 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 doorgesneden 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 die een goede beschrijving kan geven van (voorbijgaande) hypothyreoïdie op de verschillende orgaansystemen in het lichaam, en belangrijker nog, de interactie tussen deze organen.

Door een aantal verschillende vraagstellingen te combineren binnen 1 dierexperiment proberen wij het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te beperken. Eerdere experimenten lieten zien dat er een duidelijke ouder-afhankelijkheid is, waardoor de statistische eenheid uiteindelijk bij het moederdier ligt, en er dus geen twee dieren uit 1 nest tegelijkertijd kunnen worden opgeofferd. Wanneer bijvoorbeeld het vraagstuk over de voortplantingscapaciteit van de hypothyreoïde nakomelingen afzonderlijk zou moeten worden onderzocht, zouden wij dus 20 nieuwe hypothyreoïde moeders nodig, die ieder zo'n 10 hypothyreoïde nakomelingen geven waarvan wij er uiteindelijk dus maar 2 gebruiken (een mannetje en een vrouwtje). Door andere vraagstellingen nu te combineren met deze besparen wij vele proefdieren.

Voordelen van het parallel uitvoeren van experimenten met transient hypothyreoïde dieren en PTU hypothyreoïde dieren is de besparing van de euthyreoïde controlegroep. Eveneens geeft een groter aantal moederdieren meer speelruimte in de planning van de experimenten.

Een nadeel van fasering is dat een goede planning is vereist. Dit is ook de reden dat [REDACTED] en [REDACTED] zelf de planning zullen verzorgen opdat alle dieren optimaal benut zullen worden in een voor het personeel werkbaar schema.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008048.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	25					01	1	1	1	3

Hypothyroid man	1	02	1	60	01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	60	01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	30	01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	15	01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	60	01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	60	01	4	1	1	1
Hypo moederdieren 1e generatie	1	02	1	20	01	4	1	2	1
Transient day 14, man	1	02	1	20	01	4	1	2	1
Transient day 28, man	1	02	1	21	01	4	1	2	1
PTU continued, man	1	02	1	15	01	4	1	3	1
Transient PTU day 28, man	1	02	1	40	01	4	1	3	1
Transient day 14, vrouw	1	02	1	20	01	4	1	1	1
Transient day 14, moeders	1	02	1	5	01	4	1	2	1
PTU moeders	1	02	1	11	01	4	1	2	2
PTU continued, vrouw	1	02	1	55	01	4	1	3	2
nakomelingen 2e generatie	1	02	1	30	01	4	1	3	1
Mogelijk surplus hypothyreoidie	1	02	1	19	01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effect van voorbijgaande en chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, en schildklier

Aanmeldcode / Protocol: 2008048.c

Stadia van de proef:

26-05-2008	Aangemeld	
29-05-2008	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
30-05-2008	Eigenaar gewijzigd	
14-08-2008	Wijzigen	
29-08-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042, 2006043 en 2007033. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het vervolg op het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoïdie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], mede in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted]. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted]

[redacted] De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd.

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 schildklierhormoon 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). Daarnaast hebben we uit het vorige experiment aanwijzingen gevonden dat de expressie van de androgeen receptor in de Sertoli cellen vertraagd is. Binding van androgenen aan deze receptor is van essentieel belang voor de ontwikkeling van de testis. Om deze waarneming verder te onderzoeken op zowel eiwit als gen niveau is nieuw testis materiaal noodzakelijk.

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 zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen. Onze huidige inzichten in de ontwikkeling van het ovarium zijn echter nog beperkt. Wij willen daarom op verschillende (jonge) leeftijden naar de epigenetica kijken van deze dieren kijken. Ook willen wij juist ook op latere leeftijd kijken of de trends in de verschillen die wij vinden zich voortzetten.

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder 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. In vorige experimenten hebben wij ons gefocust op de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)). Wij willen ons nu meer focussen op de expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor. 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. Daarnaast willen we onderzoeken wanneer de androgeen receptor tot expressie komt in de Sertoli cellen en wat hiervan de gevolgen zijn voor spermatogenese.

Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen. Eveneens zullen wij een vergelijking willen maken met de afgelopen aanvragen beschreven methode om hypothyreoidie te induceren bij ratten in het Leydig cel onderzoek en de in veel studies gebruikte goitrogeen propyl thiouracil (PTU). Een aantal resultaten uit de PTU studies van anderen, hebben wij met het door ons gebruikte dieet in combinatie met perchloraat niet kunnen herhalen, waarschijnlijk doordat PTU eveneens directe effecten heeft op Leydig cel functie en mogelijk ook ontwikkeling. Voorgaand onderzoek (uitgevoerd door anderen) beschrijft de schildklierhormoon status slecht tot niet, waardoor interpretatie van deze resultaten zeer lastig is. Eveneens zijn er binnen het Leydig cel onderzoek twee lijnen, een lijn beweert wel Leydig cellen te zien ontwikkelen, waar de andere lijn beweert geen Leydig cel tot ontwikkeling te zien komen. Door nu ons onderzoek met PTU studies uit te breiden kunnen we een direct vergelijking maken met ons (meer fysiologische) model.

Daartoe zullen een aantal extra leeftijdsgroepen worden toegevoegd als uitbreiding op een voorgaand experiment waarbij de hypothyreoidie teniet werd gedaan op dag 28 na geboorte.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoidie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 120 dagen).

Concreet doel experimenten met

- *hypothyreotide vrouwtjes: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor, de ontwikkeling van de follikel voorraad en de versnelde afname daarvan

- *hypothyreoidie vrouwtjes op latere leeftijd: depletie van follikel voorraad, verminderde ovulatiecapaciteit van het ovarium wat uit pilot-experimenten een grotere invloed leek te hebben dan de depletie van de follikel voorraad, mogelijkheid tot voortplanting

- +chronische hypothyreoidie in mannen: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor tijdens de ontwikkeling van de testis, en de gevolgen voor het verloop van de spermatogenese

- +transient hypothyreotide mannen: zie chronisch hypothyreotide mannen, plus uitbreiding voorgaand experiment tot een leeftijd van 120 dagen (voorgaand experiment liep tot 77 dagen postpartum en gaf een opvallend herstel in Leydig cel ontwikkeling en testis gewicht tot controle niveaus. Deze ontwikkeling zou zich echter kunnen doorzetten wat zou kunnen leiden tot absolute macro-orchidie).

- +PTU mannen: zie chronische hypothyreoidie, ontwikkeling van de Leydig cel op jonge leeftijd heeft extra aandacht omdat andere PTU studies geen ontwikkeling van Leydig cellen hebben waargenomen ten tijde van de PTU toediening (tot dag 28 postpartum) waar wij dit in ons model wel hebben waargenomen. Deze groepen rapporteerden echter wel een vergrootte populatie Leydig cellen op latere leeftijd (ver na het stoppen van de PTU toedieningen).

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 hypothyreoïdie op organen zoals de lever, nier, schildklier, hersenen en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 04-06-2008 tot 04-12-2008

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	25	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	60	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	60	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie
Hypo moederdieren	30	ratten	Hypothyreoïd
Controle moederdieren	15	ratten	Controle dieet
Controle man	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Hypo moederdieren 1e generatie	20	ratten	Hypothyreoïd, 1e generatie,
paring en dracht			
Transient day 14, man	20	ratten	Hypothyreoïd, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 28, man	21	ratten	Hypothyreoïd, op dag 28 naar controle dieet
PTU continued, man	15	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie
Transient PTU day 28, man	40	ratten	PTU vanaf geboorte tot dag 28
Transient day 14, vrouw	20	ratten	Hypothyreoïd, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 14, moeders	5	ratten	Hypothyreoïd, op dag 14 van worp naar
controle dieet			
PTU moeders	11	ratten	PTU vanaf worp, sectie dag 28
PTU continued, vrouw	55	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie (dag 28)
nakomelingen 2e generatie	30	ratten	Hypothyreoïd, 2e generatie
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	29	ratten	Hypothyreoïd, 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 (en andere) laboratorium is in Wistar ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 5 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 120 dagen) the effecten van hypothyreoïdie op gevorderde leeftijd bestuderen.

*Bij het PTU experiment is gekozen voor 11 moeders. Deze zullen zo'n 10 nakomelingen per nest geven. 55 vrouwtjes (sectie dag 28) en 55 mannetjes welke worden opgesplitst in 40 dieren die na dag 28 over zullen gaan op een controle dieet, en 15 dieren die voor dag 28 zullen worden opgeofferd.

*Bij de transient dag 14 dieren is gekozen voor 5 moeders (het minimum voor 5 onafhankelijke statistische eenheden) die gemiddeld 10 nakomelingen geven waarvan wij in totaal 8 dieren zullen gebruiken per moeder (dus 20 mannen en 20 vrouwen). Voor dag 14 zijn deze dieren dus hypothyreoïd en kunnen de resterende dieren onder de chronische hypothyreoïde dieren vallen.

*Bij de euthyreoïde controle moeders is gekozen voor 15 dieren. Deze dieren zullen waarschijnlijk niet allen drachtig worden binnen de gestelde termijn (dit is overigens ook bij de PTU moeders het geval, maar die worden middels deze groep gecorrigeerd). Op basis voor onze voorgaande experimenten komen wij dan op gemiddeld 120 nakomelingen (60 mannen en 60 vrouwen).

*Van de hypothyreoïde moederdieren zullen de nakomelingen worden verdeeld onder de transient dag 28 groep, en de chronisch hypothyreoïde groep dieren. Wij gebruiken 25 moederdieren. Van deze moederdieren zal ongeveer 80% binnen de gestelde termijn drachtig worden. De nestgrootte van deze dieren is echter iets lager dan bij de controle dieren waardoor wij ongeveer 180 nakomelingen verwachten. De surplus dieren zullen worden afgevoerd tot een aantal van 81 mannelijke en 80 vrouwelijke nakomelingen resteerd.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient PTU day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
nakomelingen 2e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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, of met 0.1% propyl thiouracil. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 61 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 25 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 3-4 gehuisvest. Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 35 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 26 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 dekken drachtig te zijn (op basis van sperma resten in de vaginale lavage). Wanneer dit niet het geval is zal het vrouwtje worden afgevoerd. Na het vinden van spermaresten in de vaginale lavage zal worden gestopt met het nemen van uitstrijkjes.

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.

Op de dag van werpen zullen 11 moeders overgaan van een controle dieet naar een controle dieet met 0.1% propylthiouracil (PTU) in het drinkwater. PTU wordt gebruikt als medicament tegen hyperthyreoidie en in een euthyreïde status induceert het hypothyreoidie. Eerdere studies op het gebied van de Leydig cel ontwikkeling gebruikten PTU om hypothyreoidie te induceren. Dat heeft geleid tot resultaten die wij met ons dieet in combinatie met perchloraat niet konden herhalen, waarschijnlijk door de directe effecten van PTU op de Leydig cel. Wij breiden nu deze voorgaande studies uit, en maken zo direct een vergelijking met ons (meer fysiologische) model. Op dag 16, 21 en 28 zullen 5 dieren worden opgeofferd. Alle vrouwtjes zullen op dag 28 worden opgeofferd.

Het PTU dieet zal op dag 28 worden stopgezet, en de nakomelingen gaan terug naar het controle dieet. Op dag 35, 42, 50, 63, 76, 86, 100 en 120 zullen 5 dieren per leeftijd worden opgeofferd.

5 moederdieren met hun pups zullen overgaan van het hypothyreoïde dieet naar een controle dieet op dag 14 postpartum. De pups worden op dag 28 gespeend, de moeders worden op dezelfde dag afgevoerd. De mannelijke nakomelingen zullen op dag 64, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep). De 20 vrouwelijke nakomelingen zullen op de dag van spenen worden afgevoerd. Wij zullen proberen de resterende nakomelingen van deze moeders zo goed mogelijk binnen de groep "hypothyroid man/vrouw" te gebruiken voor dag 14, opdat een zo klein mogelijk aantal dieren als surplus afgevoerd zou moeten worden.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 7, 9, 12, 16 en 21 dagen zullen 8 vrouwtjes en 8 mannetjes van het hypothyreoïde

danwel controle dieet worden opgeofferd. Op dag 100 en 120 zullen 10 ratten per geslacht worden opgeofferd (hypothyreoide mannen worden hergebruikt na paring met hypothyreoide vrouwtjes - zie hieronder).

Op een leeftijd van 28 dagen zullen 21 mannen worden overgezet van een hypothyreoïd dieet naar het controle dieet. Deze dieren zullen op dag 76, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep, 1 reserve dier)

20 hypothyreoide vrouwtjes zullen worden aangehouden tot een leeftijd van 9 weken waarop wordt gestart met het nemen van vaginale lavages. In week 11 zullen hypothyreoide mannen bij de vrouwtjes worden gezet en zal worden gekeken of deze eerste generatie vrouwtjes in staat is om drachtig te worden. De eventuele nakomelingen zullen tot dag 28 worden gevolgd. Op basis van eerdere experimenten verwachten wij ongeveer 5 nesten met een gemiddelde nestgrootte van 6 dieren. Hieruit komen dus ongeveer 30 dieren voort. Deze dieren worden op dag 28 afgevoerd.

Alle mannelijke dieren krijgen een injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU; 150 mg/kg lichaamsgewicht in fysiologisch zout) 2 uur voordat ze worden opgeofferd. BrdU is een thymidine analoog die ingebouwd wordt in het DNA van cellen in de S-fase van de celcyclus en als zodanig een marker voor de delingsactiviteit van cellen.

Uit alle dieren zullen gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere immunohistologische en moleculaire analyse. 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, vrij T4, vrij T3, vrij testosterone en corticosteron.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	B. Gering/Matig
Transient day 14, man	B. Gering/Matig
Transient day 28, man	B. Gering/Matig
PTU continued, man	C. Matig
Transient PTU day 28, man	C. Matig
Transient day 14, vrouw	A. Gering
Transient day 14, moeders	B. Gering/Matig
PTU moeders	B. Gering/Matig
PTU continued, vrouw	C. Matig
nakomelingen 2e generatie	C. Matig
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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.

Injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU) van de mannen 2 uur voorafgaande aan de sectie.
Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes)

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren en mogelijk 2e generatie dieren.

Voor dieren van 16 dagen en ouder geldt: 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. Dieren tot een leeftijd van 12 dagen worden zonder voorafgaande narcose gedecapiteerd.

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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 28, man | D. Is wel toegepast. |
| PTU continued, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient PTU day 28, man | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, vrouw | D. Is wel toegepast. |
| Transient day 14, moeders | D. Is wel toegepast. |
| PTU moeders | D. Is wel toegepast. |
| PTU continued, vrouw | D. Is wel toegepast. |
| nakomelingen 2e generatie | D. Is wel toegepast. |
| Mogelijk surplus hypothyreoïdie | 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. |
| Hypo moederdieren 1e generatie | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 28, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU continued, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient PTU day 28, man | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, vrouw | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Transient day 14, moeders | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU moeders | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| PTU continued, vrouw | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| nakomelingen 2e generatie | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| Mogelijk surplus hypothyreoïdie | 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.
Hypo moederdieren 1e generatie	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Transient day 14, man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Transient day 28, man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
PTU continued, man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Transient PTU day 28, man	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Transient day 14, vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Transient day 14, moeders	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
PTU moeders	Het dier is gedood na het einde van de proef.
PTU continued, vrouw	Het dier is gedood na het einde van de proef.
nakomelingen 2e generatie	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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 die een goede beschrijving kan geven van (voorbijgaande) hypothyreoïdie op de verschillende orgaansystemen in het lichaam, en belangrijker nog, de interactie tussen deze organen.

Door een aantal verschillende vraagstellingen te combineren binnen 1 dierexperiment proberen wij het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te beperken. Eerdere experimenten lieten zien dat er een duidelijke ouder-afhankelijkheid is, waardoor de statistische eenheid uiteindelijk bij het moederdier ligt, en er dus geen twee dieren uit 1 nest tegelijkertijd kunnen worden opgeofferd. Wanneer bijvoorbeeld het vraagstuk over de voortplantingscapaciteit van de hypothyreoïde nakomelingen afzonderlijk zou moeten worden onderzocht, zouden wij dus 20 nieuwe hypothyreoïde moeders nodig, die ieder zo'n 10 hypothyreoïde nakomelingen geven waarvan wij er uiteindelijk dus maar 2 gebruiken (een mannetje en een vrouwtje). Door andere vraagstellingen nu te combineren met deze besparen wij vele proefdieren.

Voordelen van het parallel uitvoeren van experimenten met transient hypothyreoïde dieren en PTU hypothyreoïde dieren is de besparing van de euthyreoïde controlegroep. Eveneens geeft een groter aantal moederdieren meer speelruimte in de planning van de experimenten.

Een nadeel van fasering is dat een goede planning is vereist. Dit is ook de reden dat [REDACTED] en [REDACTED] zelf de planning zullen verzorgen opdat alle dieren optimaal benut zullen worden in een voor het personeel werkbaar schema.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008048.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	25					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	30					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	15					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	60					01	4	1	1	1
Hypo moederdieren 1e generatie	1	02	1	20						01	4	1	2
Transient day 14, man	1	02	1	20					01	4	1	2	1
Transient day 28, man	1	02	1	21					01	4	1	2	1
PTU continued, man	1	02	1	15					01	4	1	3	1
Transient PTU day 28, man	1	02	1	40					01	4	1	3	1
Transient day 14, vrouw	1	02	1	20					01	4	1	1	1
Transient day 14, moeders	1	02	1	5					01	4	1	2	1
PTU moeders	1	02	1	11					01	4	1	2	2
PTU continued, vrouw	1	02	1	55					01	4	1	3	2
nakomelingen 2e generatie	1	02	1	30					01	4	1	3	1
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	1	02	1	29						01	4	1	2

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effect van voorbijgaande en chronische hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, en schildklier

Aanmeldcode / Protocol: 2008048.d

Stadia van de proef:

29-08-2008	Aangemeld	
02-09-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
02-09-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042, 2006043 en 2007033. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het vervolg op het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], mede in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted]. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted]

De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd.

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 schildklierhormoon 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). Daarnaast hebben we uit het vorige experiment aanwijzingen gevonden dat de expressie van de androgeen receptor in de Sertoli cellen vertraagd is. Binding van androgenen aan deze receptor is van essentieel belang voor de ontwikkeling van de testis. Om deze waarneming verder te onderzoeken op zowel eiwit als gen niveau is nieuw testis materiaal noodzakelijk.

Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoidie 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 zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen. Onze huidige inzichten in de ontwikkeling van het ovarium zijn echter nog beperkt. Wij willen daarom op verschillende (jonge) leeftijden naar de epigenetica kijken van deze dieren kijken. Ook willen wij juist ook op latere leeftijd kijken of de trends in de verschillen die wij vinden zich voortzetten.

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder 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 hypothyreoïdie. In vorige experimenten hebben wij ons gefocust op de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)). Wij willen ons nu meer focussen op de expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor. 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. Daarnaast willen we onderzoeken wanneer de androgeen receptor tot expressie komt in de Sertoli cellen en wat hiervan de gevolgen zijn voor spermatogenese.

Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen. Eveneens zullen wij een vergelijking willen maken met de afgelopen aanvragen beschreven methode om hypothyreoïdie te induceren bij ratten in het Leydig cel onderzoek en de in veel studies gebruikte goitrogeen propyl thiouracil (PTU). Een aantal resultaten uit de PTU studies van anderen, hebben wij met het door ons gebruikte dieet in combinatie met perchloraat niet kunnen herhalen, waarschijnlijk doordat PTU eveneens directe effecten heeft op Leydig cel functie en mogelijk ook ontwikkeling. Voorgaand onderzoek (uitgevoerd door anderen) beschrijft de schildklierhormoon status slecht tot niet, waardoor interpretatie van deze resultaten zeer lastig is. Eveneens zijn er binnen het Leydig cel onderzoek twee lijnen, een lijn beweert wel Leydig cellen te zien ontwikkelen, waar de andere lijn beweert geen Leydig cel tot ontwikkeling te zien komen. Door nu ons onderzoek met PTU studies uit te breiden kunnen we een direct vergelijking maken met ons (meer fysiologische) model.

Daartoe zullen een aantal extra leeftijdsgroepen worden toegevoegd als uitbreiding op een voorgaand experiment waarbij de hypothyreoïdie teniet werd gedaan op dag 28 na geboorte.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 120 dagen).

Concreet doel experimenten met

- *hypothyreoïde vrouwtjes: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor, de ontwikkeling van de follikel voorraad en de versnelde afname daarvan

- *hypothyreoïde vrouwtjes op latere leeftijd: depletie van follikel voorraad, verminderde ovulatiecapaciteit van het ovarium wat uit pilot-experimenten een grotere invloed leek te hebben dan de depletie van de follikel voorraad, mogelijkheid tot voortplanting

- +chronische hypothyreoïdie in mannen: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor tijdens de ontwikkeling van de testis, en de gevolgen voor het verloop van de spermatogenese

- +transient hypothyreoïde mannen: zie chronisch hypothyreoïde mannen, plus uitbreiding voorgaand experiment tot een leeftijd van 120 dagen (voorgaand experiment liep tot 77 dagen postpartum en gaf een opvallend herstel in Leydig cel ontwikkeling en testis gewicht tot controle niveaus. Deze ontwikkeling zou zich echter kunnen doorzetten wat zou kunnen leiden tot absolute macro-orchidie).

- +PTU mannen: zie chronische hypothyreoïdie, ontwikkeling van de Leydig cel op jonge leeftijd heeft extra aandacht omdat andere PTU studies geen ontwikkeling van Leydig cellen hebben waargenomen ten tijde van de PTU toediening (tot dag 28 postpartum) waar wij dit in ons model wel hebben waargenomen. Deze groepen rapporteerden echter wel een vergrootte populatie Leydig cellen op latere leeftijd (ver na het stoppen van de PTU toedieningen).

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 hypothyreoïdie op organen zoals de lever, nier, schildklier,

hersenen en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 01-09-2008 tot 30-01-2009

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	25	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	60	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	60	ratten	Hypothyreood, 1e generatie
Hypo moederdieren	30	ratten	Hypothyreood
Controle moederdieren	15	ratten	Controle dieet
Controle man	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Hypo moederdieren 1e generatie	20	ratten	Hypothyreood, 1e generatie,
paring en dracht			
Transient day 14, man	20	ratten	Hypothyreood, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 28, man	21	ratten	Hypothyreood, op dag 28 naar controle dieet
PTU continued, man	15	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie
Transient PTU day 28, man	40	ratten	PTU vanaf geboorte tot dag 28
Transient day 14, vrouw	20	ratten	Hypothyreood, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 14, moeders	5	ratten	Hypothyreood, op dag 14 van worp naar
controle dieet			
PTU moeders	11	ratten	PTU vanaf worp, sectie dag 28
PTU continued, vrouw	55	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie (dag 28)
nakomelingen 2e generatie	30	ratten	Hypothyreood, 2e generatie
Mogelijk surplus hypothyreoidie	29	ratten	Hypothyreood, 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 (en andere) laboratorium is in Wistar ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 5 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 120 dagen) the effecten van hypothyreoidie op gevorderde leeftijd bestuderen.

*Bij het PTU experiment is gekozen voor 11 moeders. Deze zullen zo'n 10 nakomelingen per nest geven.

55 vrouwtjes (sectie dag 28) en 55 mannetjes welke worden opgesplitst in 40 dieren die na dag 28 over zullen gaan op een controle dieet, en 15 dieren die voor dag 28 zullen worden opgeofferd.

*Bij de transient dag 14 dieren is gekozen voor 5 moeders (het minimum voor 5 onafhankelijke statistische eenheden) die gemiddeld 10 nakomelingen geven waarvan wij in totaal 8 dieren zullen gebruiken per moeder (dus 20 mannen en 20 vrouwen). Voor dag 14 zijn deze dieren dus hypothyreoïd en kunnen de resterende dieren onder de chronische hypothyreoïde dieren vallen.

*Bij de euthyreoïde controle moeders is gekozen voor 15 dieren. Deze dieren zullen waarschijnlijk niet allen drachtig worden binnen de gestelde termijn (dit is overigens ook bij de PTU moeders het geval, maar die worden middels deze groep gecorrigeerd). Op basis voor onze voorgaande experimenten komen wij dan op gemiddeld 120 nakomelingen (60 mannen en 60 vrouwen).

*Van de hypothyreoïde moederdieren zullen de nakomelingen worden verdeeld onder de transient dag 28 groep, en de chronisch hypothyreoïde groep dieren. Wij gebruiken 25 moederdieren. Van deze moederdieren zal ongeveer 80% binnen de gestelde termijn drachtig worden. De nestgrootte van deze dieren is echter iets lager dan bij de controle dieren waardoor wij ongeveer 180 nakomelingen verwachten. De surplus dieren zullen worden afgevoerd tot een aantal van 81 mannelijke en 80 vrouwelijke nakomelingen resteerd.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient PTU day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
nakomelingen 2e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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, of met 0.1% propyl thiouracyl. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 61 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 25 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 3-4 gehuisvest. Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 35 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 26 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 dekken drachtig te zijn (op basis van sperma resten in de vaginale lavage). Wanneer dit niet het geval is zal het vrouwtje worden afgevoerd. Na het vinden van spermaresten in de vaginale lavage zal worden gestopt met het nemen van uitstrijkjes.

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.

Op de dag van werpen zullen 11 moeders overgaan van een controle dieet naar een controle dieet met 0.1% propylthiouracil (PTU) in het drinkwater. PTU wordt gebruikt als medicament tegen hyperthyreoïdie en in een euthyreïde status induceert het hypothyreoïdie. Eerdere studies op het gebied van de Leydig cel ontwikkeling gebruikten PTU om hypothyreoïdie te induceren. Dat heeft geleid tot resultaten die wij met ons dieet in combinatie met perchloraat niet konden herhalen, waarschijnlijk door de directe effecten van PTU op de Leydig cel. Wij breiden nu deze voorgaande studies uit, en maken zo direct een vergelijking met ons (meer fysiologische) model. Op dag 16, 21 en 28 zullen 5 dieren worden opgeofferd. Alle vrouwtjes zullen op dag 28 worden opgeofferd.

Het PTU dieet zal op dag 28 worden stopgezet, en de nakomelingen gaan terug naar het controle dieet. Op dag 35, 42, 50, 63, 76, 86, 100 en 120 zullen 5 dieren per leeftijd worden opgeofferd.

5 moederdieren met hun pups zullen overgaan van het hypothyreoïde dieet naar een controle dieet op dag 14 postpartum. De pups worden op dag 28 gespeend, de moeders worden op dezelfde dag afgevoerd. De mannelijke nakomelingen zullen op dag 64, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep). De 20 vrouwelijke nakomelingen zullen op de dag van spenen worden afgevoerd. Wij zullen proberen de resterende nakomelingen van deze moeders zo goed mogelijk binnen de groep "hypothyroid man/vrouw" te gebruiken voor dag 14, opdat een zo klein mogelijk aantal dieren als surplus afgevoerd zou moeten worden.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 7, 9, 12, 16 en 21 dagen zullen 8 vrouwtjes en 8 mannetjes van het hypothyreoïde danwel controle dieet worden opgeofferd. Op dag 100 en 120 zullen 10 ratten per geslacht worden opgeofferd (hypothyreoïde mannen worden hergebruikt na paring met hypothyreoïde vrouwtjes - zie hier

onder).

Op een leeftijd van 28 dagen zullen 21 mannen worden overgezet van een hypothyreoïd dieet naar het controle dieet. Deze dieren zullen op dag 76, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep, 1 reserve dier)

20 hypothyreoïde vrouwtjes zullen worden aangehouden tot een leeftijd van 9 weken waarop wordt gestart met het nemen van vaginale lavages. In week 11 zullen hypothyreoïde mannen bij de vrouwtjes worden gezet en zal worden gekeken of deze eerste generatie vrouwtjes in staat is om drachtig te worden. De eventuele nakomelingen zullen tot dag 28 worden gevolgd. Op basis van eerdere experimenten verwachten wij ongeveer 5 nesten met een gemiddelde nestgrootte van 6 dieren. Hieruit komen dus ongeveer 30 dieren voort. Deze dieren worden op dag 28 afgevoerd.

Alle mannelijke dieren krijgen een injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU; 150 mg/kg lichaamsgewicht in fysiologisch zout) 2 uur voordat ze worden opgeofferd. BrdU is een thymidine analoog die ingebouwd wordt in het DNA van cellen in de S-fase van de celcyclus en als zodanig een marker voor de delingsactiviteit van cellen.

Uit alle dieren zullen gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere immunohistologische en moleculaire analyse. 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, vrij T4, vrij T3, vrij testosterone en corticosteron.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	B. Gering/Matig
Transient day 14, man	B. Gering/Matig
Transient day 28, man	B. Gering/Matig
PTU continued, man	C. Matig
Transient PTU day 28, man	C. Matig
Transient day 14, vrouw	A. Gering
Transient day 14, moeders	B. Gering/Matig
PTU moeders	B. Gering/Matig
PTU continued, vrouw	C. Matig
nakomelingen 2e generatie	C. Matig
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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.

Injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU) van de mannen 2 uur voorafgaande aan de sectie.
Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwtjes)

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren en mogelijk 2e generatie dieren.

Voor dieren van 16 dagen en ouder geldt: narcose mbv CO₂/O₂ waarna de borstkas van de dieren wordt geopend, het middenrif doorgesneden en bloed afgenomen via een hartpunctie. Hierna worden de dieren gedood dmv decapitatie. Dieren tot een leeftijd van 12 dagen worden zonder voorafgaande narcose gedecapiteerd.

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.
Hypo moederdieren 1e generatie	D. Is wel toegepast.
Transient day 14, man	D. Is wel toegepast.
Transient day 28, man	D. Is wel toegepast.
PTU continued, man	D. Is wel toegepast.
Transient PTU day 28, man	D. Is wel toegepast.
Transient day 14, vrouw	D. Is wel toegepast.
Transient day 14, moeders	D. Is wel toegepast.
PTU moeders	D. Is wel toegepast.
PTU continued, vrouw	D. Is wel toegepast.
nakomelingen 2e generatie	D. Is wel toegepast.
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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.
Hypo moederdieren 1e generatie	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Transient day 14, man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Transient day 28, man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
PTU continued, man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Transient PTU day 28, man	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Transient day 14, vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Transient day 14, moeders	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
PTU moeders	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
PTU continued, vrouw	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
nakomelingen 2e generatie	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	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 beindiging van de proef.
Hypothyroid vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging 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 beindiging van de proef.
Controle vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Hypo moederdieren 1e generatie	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Transient day 14, man	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Transient day 28, man	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
PTU continued, man	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Transient PTU day 28, man	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Transient day 14, vrouw	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Transient day 14, moeders	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
PTU moeders	Het dier is gedood na het einde van de proef.
PTU continued, vrouw	Het dier is gedood na het einde van de proef.
nakomelingen 2e generatie	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	Het dier is gestorven of gedood ter beindiging 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 die een goede beschrijving kan geven van (voorbijgaande) hypothyreoïdie op de verschillende orgaansystemen in het lichaam, en belangrijker nog, de interactie tussen deze organen.

Door een aantal verschillende vraagstellingen te combineren binnen 1 dierexperiment proberen wij het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te beperken. Eerdere experimenten lieten zien dat er een duidelijke ouder-afhankelijkheid is, waardoor de statistische eenheid uiteindelijk bij het moederdier ligt, en er dus geen twee dieren uit 1 nest tegelijkertijd kunnen worden opgeofferd. Wanneer bijvoorbeeld het vraagstuk over de voortplantingscapaciteit van de hypothyreoïde nakomelingen afzonderlijk zou moeten worden onderzocht, zouden wij dus 20 nieuwe hypothyreoïde moeders nodig, die ieder zo'n 10 hypothyreoïde nakomelingen geven waarvan wij er uiteindelijk dus maar 2 gebruiken (een mannetje en een vrouwtje). Door andere vraagstellingen nu te combineren met deze besparen wij vele proefdieren.

Voordelen van het parallel uitvoeren van experimenten met transient hypothyreoïde dieren en PTU hypothyreoïde dieren is de besparing van de euthyreoïde controlegroep. Eveneens geeft een groter aantal moederdieren meer speelruimte in de planning van de experimenten.

Een nadeel van fasering is dat een goede planning is vereist. Dit is ook de reden dat [REDACTED] en [REDACTED] zelf de planning zullen verzorgen opdat alle dieren optimaal benut zullen worden in een voor het personeel werkbaar schema.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008048.d (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	25					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	30					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	15					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	60					01	4	1	1	1
Hypo moederdieren 1e generatie	1	02	1	20					01	4	1	2	1
Transient day 14, man	1	02	1	20					01	4	1	2	1
Transient day 28, man	1	02	1	21					01	4	1	2	1
PTU continued, man	1	02	1	15					01	4	1	3	1
Transient PTU day 28, man	1	02	1	40					01	4	1	3	1
Transient day 14, vrouw	1	02	1	20					01	4	1	1	1
Transient day 14, moeders	1	02	1	5					01	4	1	2	1
PTU moeders	1	02	1	11					01	4	1	2	2
PTU continued, vrouw	1	02	1	55					01	4	1	3	2
nakomelingen 2e generatie	1	02	1	30					01	4	1	3	1
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	1	02	1	29					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effect van voorbijgaande en chronische hypothyreoidie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, en schildklier

Aanmeldcode / Protocol: 2008048.e

Stadia van de proef:

02-09-2008	Aangemeld	
04-09-2008	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
06-02-2009	Registratie achteraf aangemaakt	
03-06-2009	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Dit project borduurt voort op project 2002070, 2004063, 2003077, 2004135, 2005040, 2005101, 2006006, 2006042, 2006043 en 2007033. De proef wordt uitgevoerd in het kader van het vervolg op het aio-project "effecten van milde hyper- en hypothyreoidie op de ontwikkeling der mannelijke gonaden" van [redacted], mede in het kader van het voortgaande onderzoek van [redacted]. Buiten het [redacted] wordt binnen dit project samengewerkt met [redacted]

[redacted] De staf van [redacted] heeft dit project besproken en goedgekeurd.

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 schildklierhormoon 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). Daarnaast hebben we uit het vorige experiment aanwijzingen gevonden dat de expressie van de androgeen receptor in de Sertoli cellen vertraagd is. Binding van androgenen aan deze receptor is van essentieel belang voor de ontwikkeling van de testis. Om deze waarneming verder te onderzoeken op zowel eiwit als gen niveau is nieuw testis materiaal noodzakelijk.

Uit het onderzoek naar de rol van hypothyreoidie 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 zijn. Dit zou een verklaring kunnen vormen voor het feit dat deze pups min of meer op de normale tijd in de puberteit komen. Onze huidige inzichten in de ontwikkeling van het ovarium zijn echter nog beperkt. Wij willen daarom op verschillende (jonge) leeftijden naar de epigenetica kijken van deze dieren kijken. Ook willen wij juist ook op latere leeftijd kijken of de trends in de verschillen die wij vinden zich voortzetten.

Op grond van de resultaten uit de vorige proeven willen we verder 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 hypothyreoïdie. In vorige experimenten hebben wij ons gefocust op de deiodinasen type 1 en 2 (betrokken bij de omzetting van inactief T4 naar actief schildklierhormoon (T3)). Wij willen ons nu meer focussen op de expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor. 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. Daarnaast willen we onderzoeken wanneer de androgeen receptor tot expressie komt in de Sertoli cellen en wat hiervan de gevolgen zijn voor spermatogenese.

Om deze experimenten uit te voeren is het noodzakelijk om nieuw materiaal te verzamelen. Eveneens zullen wij een vergelijk willen maken met de afgelopen aanvragen beschreven methode om hypothyreoïdie te induceren bij ratten in het Leydig cel onderzoek en de in veel studies gebruikte goitrogeen propyl thiouracyl (PTU). Een aantal resultaten uit de PTU studies van anderen, hebben wij met het door ons gebruikte dieet in combinatie met perchloraat niet kunnen herhalen, waarschijnlijk doordat PTU eveneens directe effecten heeft op Leydig cel functie en mogelijk ook ontwikkeling. Voorgaand onderzoek (uitgevoerd door anderen) beschrijft de schildklierhormoon status slecht tot niet, waardoor interpretatie van deze resultaten zeer lastig is. Eveneens zijn er binnen het Leydig cel onderzoek twee lijnen, een lijn beweert wel Leydig cellen te zien ontwikkelen, waar de andere lijn beweert geen Leydig cel tot ontwikkeling te zien komen. Door nu ons onderzoek met PTU studies uit te breiden kunnen we een direct vergelijk maken met ons (meer fysiologische) model.

Daartoe zullen een aantal extra leeftijdsgroepen worden toegevoegd als uitbreiding op een voorgaand experiment waarbij de hypothyreoïdie teniet werd gedaan op dag 28 na geboorte.

Parallel hieraan willen we onderzoeken welke effecten hypothyreoïdie hebben op de ontwikkeling van de mannelijke en vrouwelijke gonaden op latere leeftijd (100 en 120 dagen).

Concreet doel experimenten met

- *hypothyreoïde vrouwtjes: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor, de ontwikkeling van de follikel voorraad en de versnelde afname daarvan

- *hypothyreoïde vrouwtjes op latere leeftijd: depletie van follikel voorraad, verminderde ovulatiecapaciteit van het ovarium wat uit pilot-experimenten een grotere invloed leek te hebben dan de depletie van de follikel voorraad, mogelijkheid tot voortplanting

- +chronische hypothyreoïdie in mannen: expressie van schildklierhormoon receptoren en de androgeen receptor tijdens de ontwikkeling van de testis, en de gevolgen voor het verloop van de spermatogenese

- +transient hypothyreoïde mannen: zie chronisch hypothyreoïde mannen, plus uitbreiding voorgaand experiment tot een leeftijd van 120 dagen (voorgaand experiment liep tot 77 dagen postpartum en gaf een opvallend herstel in Leydig cel ontwikkeling en testis gewicht tot controle niveaus. Deze ontwikkeling zou zich echter kunnen doorzetten wat zou kunnen leiden tot absolute macro-orchedie).

- +PTU mannen: zie chronische hypothyreoïdie, ontwikkeling van de Leydig cel op jonge leeftijd heeft extra aandacht omdat andere PTU studies geen ontwikkeling van Leydig cellen hebben waargenomen ten tijde van de PTU toediening (tot dag 28 postpartum) waar wij dit in ons model wel hebben waargenomen. Deze groepen rapporteerden echter wel een vergrootte populatie Leydig cellen op latere leeftijd (ver na het stoppen van de PTU toedieningen).

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 diemodel (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 lever, nier, schildklier, hersenen en vetweefsel. Deze studie is een model voor de ontwikkeling van de gonaden in kinderen bij de foetale en neonatale periode.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 03-09-2008 tot 30-01-2009

3. Specificatie diergroepen:

Bronstcontrole man	25	ratten	Bronstcontrole en dracht
Hypothyroid man	60	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypothyroid vrouw	60	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Hypo moederdieren	30	ratten	Hypothyreoid
Controle moederdieren	15	ratten	Controle dieet
Controle man	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Controle vrouw	60	ratten	Controle dieet, 1e generatie
Hypo moederdieren 1e generatie	20	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie,
paring en dracht			
Transient day 14, man	20	ratten	Hypothyreoid, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 28, man	21	ratten	Hypothyreoid, op dag 28 naar controle dieet
PTU continued, man	15	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie
Transient PTU day 28, man	40	ratten	PTU vanaf geboorte tot dag 28
Transient day 14, vrouw	20	ratten	Hypothyreoid, op dag 14 naar controle dieet
Transient day 14, moeders	5	ratten	Hypothyreoid, op dag 14 van worp naar
controle dieet			
PTU moeders	11	ratten	PTU vanaf worp, sectie dag 28
PTU continued, vrouw	55	ratten	PTU vanaf geboorte tot sectie (dag 28)
nakomelingen 2e generatie	30	ratten	Hypothyreoid, 2e generatie
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	29	ratten	Hypothyreoid, 1e generatie
Drachtige PTU moeders	11	ratten	PTU vanaf worp, sectie dag 28
PTU continued, man	15	ratten	PTU vanaf geboorte tot aan sectie
PTU transient dag 28, man	40	ratten	PTU vanaf geboorte tot dag 28, daarna
normaal water tot aan sectie			
PTU continued, vrouw	55	ratten	PTU vanaf geboorte tot aan sectie (dag 28)

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 (en andere) laboratorium is in Wistar ratten uitgevoerd.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

In principe zijn groepsgroottes van 5 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 120 dagen) the effecten van hypothyroidie op gevorderde leeftijd bestuderen.

*Bij het PTU experiment is gekozen voor 11 moeders. Deze zullen zo'n 10 nakomelingen per nest geven. 55 vrouwtjes (sectie dag 28) en 55 mannetjes welke worden opgesplitst in 40 dieren die na dag 28 over zullen gaan op een controle dieet, en 15 dieren die voor dag 28 zullen worden opgeofferd. In het lopende experiment bleken er minder controle dieren drachtig te zijn geworden dan verwacht en was het aandeel vrouwelijke pups hoger dan verwacht. Als gevolg hiervan bleven er uiteindelijk maar 35 mannelijke controle pups over voor de PTU proef. Daar deze proef in een keer uitgevoerd dient te worden om de PTU groepen onderling met elkaar te kunnen vergelijken, en daarvoor 55 pups nodig waren, zijn deze 35 pups als surplus afgevoerd. Wij verzoeken om nu 11 drachtige moederdieren te mogen bestellen om deze alsnog op te nemen in de lopende dierproef. De opzet van de proef blijft verder gelijk aan onze eerdere aanvraag (zie hierboven). -zie ook mijn begeleidende email van vorige week.

*Bij de transient dag 14 dieren is gekozen voor 5 moeders (het minimum voor 5 onafhankelijke statistische eenheden) die gemiddeld 10 nakomelingen geven waarvan wij in totaal 8 dieren zullen gebruiken per moeder (dus 20 mannen en 20 vrouwen). Voor dag 14 zijn deze dieren dus hypothyreoïd en kunnen de resterende dieren onder de chronische hypothyreoïde dieren vallen.

*Bij de euthyreoïde controle moeders is gekozen voor 15 dieren. Deze dieren zullen waarschijnlijk niet allen drachtig worden binnen de gestelde termijn (dit is overigens ook bij de PTU moeders het geval, maar die worden middels deze groep gecorrigeerd). Op basis voor onze voorgaande experimenten komen wij dan op gemiddeld 120 nakomelingen (60 mannen en 60 vrouwen).

*Van de hypothyreoïde moederdieren zullen de nakomelingen worden verdeeld onder de transient dag 28 groep, en de chronisch hypothyreoïde groep dieren. Wij gebruiken 25 moederdieren. Van deze moederdieren zal ongeveer 80% binnen de gestelde termijn drachtig worden. De nestgrootte van deze dieren is echter iets lager dan bij de controle dieren waardoor wij ongeveer 180 nakomelingen verwachten. De surplus dieren zullen worden afgevoerd tot een aantal van 81 mannelijke en 80 vrouwelijke nakomelingen resteerd.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient PTU day 28, man	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Transient day 14, moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU moeders	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, vrouw	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
nakomelingen 2e generatie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Mogelijk surplus hypothyroidie	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Drachtige PTU moeders A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, man A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU transient dag 28, man A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
PTU continued, 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 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, of met 0.1% propyl thiouracyl. Dit perchloraat remt de opname van jodide door de schildklier, waardoor de schildklierhormoonlevels omlaag zullen gaan.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De 61 Wistar WU vrouwtjes (8 weken oud) en 25 mannetjes (14 weken oud) komen aan en worden in groepen van 3-4 gehuisvest. Dieet: Harland Teklad.

1 week na aankomst worden 35 vrouwtjes op het jodide-arme dieet gezet waaraan 0,5% natriumperchloraat is toegevoegd. 26 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 dekken drachtig te zijn (op basis van sperma resten in de vaginale lavage). Wanneer dit niet het geval is zal het vrouwtje worden afgevoerd. Na het vinden van spermaresten in de vaginale lavage zal worden gestopt met het nemen van uitstrijkjes.

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.

Op de dag van werpen zullen 11 moeders overgaan van een controle dieet naar een controle dieet met 0.1% propylthiouracil (PTU) in het drinkwater. PTU wordt gebruikt als medicament tegen hyperthyreoïdie en in een euthyreoïde status induceert het hypothyreoïdie. Eerdere studies op het gebied van de Leydig cel ontwikkeling gebruikten PTU om hypothyreoïdie te induceren. Dat heeft geleid tot resultaten die wij met ons dieet in combinatie met perchloraat niet konden herhalen, waarschijnlijk door de directe effecten van PTU op de Leydig cel. Wij breiden nu deze voorgaande studies uit, en maken zo direct een vergelijking met ons (meer fysiologische) model. Op dag 16, 21 en 28 zullen 5 dieren worden opgeofferd.

Alle vrouwtjes zullen op dag 28 worden opgeofferd.

Het PTU dieet zal op dag 28 worden stopgezet, en de nakomelingen gaan terug naar het controle dieet. Op dag 35, 42, 50, 63, 76, 86, 100 en 120 zullen 5 dieren per leeftijd worden opgeofferd.

5 moederdieren met hun pups zullen overgaan van het hypothyreoïde dieet naar een controle dieet op dag 14 postpartum. De pups worden op dag 28 gespeend, de moeders worden op dezelfde dag afgevoerd. De mannelijke nakomelingen zullen op dag 64, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep). De 20 vrouwelijke nakomelingen zullen op de dag van spenen worden afgevoerd. Wij zullen proberen de resterende nakomelingen van deze moeders zo goed mogelijk binnen de groep "hypothyroid man/vrouw" te gebruiken voor dag 14. Na het spenen blijven 14 vrouwelijke pups uit de groep die op 14 dagen is overgezet op een normaal dieet en 14 vrouwelijke dieren die op dag 28 overgezet zijn op een normaal dieet blijven zitten. Deze dieren worden op respectievelijk dag 100 en 120 opgeofferd, te samen met 5 controle dieren van dezelfde leeftijd (10 controle dieren in het totaal). De resterende surplus dieren worden na het spenen opgeofferd.

Na het spenen zullen de moederdieren worden opgeofferd.

Op een leeftijd van 7, 9, 12, 16 en 21 dagen zullen 8 vrouwtjes en 8 mannetjes van het hypothyreoïde danwel controle dieet worden opgeofferd. Op dag 100 en 120 zullen 10 ratten per geslacht worden opgeofferd (hypothyreoïde mannen worden hergebruikt na paring met hypothyreoïde vrouwtjes - zie hier onder).

Op een leeftijd van 28 dagen zullen 21 mannen worden overgezet van een hypothyreoïd dieet naar het controle dieet. Deze dieren zullen op dag 76, 86, 100 en 120 worden opgeofferd (5 dieren per groep, 1 reserve dier)

20 hypothyreoïde vrouwtjes zullen worden aangehouden tot een leeftijd van 9 weken waarop wordt gestart met het nemen van vaginale lavages. In week 11 zullen hypothyreoïde mannen bij de vrouwtjes worden gezet en zal worden gekeken of deze eerste generatie vrouwtjes in staat is om drachtig te worden. De eventuele nakomelingen zullen tot dag 28 worden gevolgd. Op basis van eerdere experimenten verwachten wij ongeveer 5 nesten met een gemiddelde nestgrootte van 6 dieren. Hieruit komen dus ongeveer 30 dieren voort. Deze dieren worden op dag 28 afgevoerd.

Alle mannelijke dieren krijgen een injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU; 150 mg/kg lichaamsgewicht in fysiologisch zout) 2 uur voordat ze worden opgeofferd. BrdU is een thymidine analoog die ingebouwd wordt in het DNA van cellen in de S-fase van de celcyclus en als zodanig een marker voor de delingsactiviteit van cellen.

Uit alle dieren zullen gonaden, schildklier, lever, nier, hersenen, en vetweefsel verzameld worden, evenals bloed getapt. De organen zullen deels worden gefixeerd, deels worden ingevroren voor nadere immunohistologische en moleculaire analyse. 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, vrij T4, vrij T3, vrij testosterone en corticosteron.

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
Hypo moederdieren 1e generatie	B. Gering/Matig
Transient day 14, man	B. Gering/Matig
Transient day 28, man	B. Gering/Matig
PTU continued, man	C. Matig
Transient PTU day 28, man	C. Matig
Transient day 14, vrouw	A. Gering
Transient day 14, moeders	B. Gering/Matig
PTU moeders	B. Gering/Matig
PTU continued, vrouw	C. Matig
nakomelingen 2e generatie	C. Matig
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	B. Gering/Matig
Drachtige PTU moeders	B. Gering/Matig
PTU continued, man	C. Matig
PTU transient dag 28, man	C. Matig
PTU continued, vrouw	C. 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.

Injectie met Bromodeoxyuridine (BrdU) van de mannen 2 uur voorafgaande aan de sectie.
Het nemen van vaginale lavages gedurende maximaal 2 weken (vrouwjes)

Achtergebleven ontwikkeling hypothyreoïde 1e generatie dieren en mogelijk 2e generatie dieren.

Voor dieren van 16 dagen en ouder geldt: 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. Dieren tot een leeftijd van 12 dagen worden zonder voorafgaande narcose gedecapiteerd.

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.
Hypo moederdieren 1e generatie	D. Is wel toegepast.
Transient day 14, man	D. Is wel toegepast.
Transient day 28, man	D. Is wel toegepast.
PTU continued, man	D. Is wel toegepast.
Transient PTU day 28, man	D. Is wel toegepast.
Transient day 14, vrouw	D. Is wel toegepast.
Transient day 14, moeders	D. Is wel toegepast.
PTU moeders	D. Is wel toegepast.
PTU continued, vrouw	D. Is wel toegepast.
nakomelingen 2e generatie	D. Is wel toegepast.

Mogelijk surplus hypothyroidie D. Is wel toegepast.

Drachtige PTU moeders D. Is wel toegepast.

PTU continued, man D. Is wel toegepast.

PTU transient dag 28, man D. Is wel toegepast.

PTU continued, vrouw 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.

Hypo moederdieren 1e generatie A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Transient day 14, man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Transient day 28, man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

PTU continued, man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Transient PTU day 28, man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Transient day 14, vrouw A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Transient day 14, moeders A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

PTU moeders A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

PTU continued, vrouw A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

nakomelingen 2e generatie A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Mogelijk surplus hypothyroidie A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Drachtige PTU moeders A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

PTU continued, man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

PTU transient dag 28, man A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

PTU continued, 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 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.

Hypo moederdieren 1e generatie Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Transient day 14, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Transient day 28, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

PTU continued, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Transient PTU day 28, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Transient day 14, vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Transient day 14, moeders Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

PTU moeders Het dier is gedood na het einde van de proef.

PTU continued, vrouw Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

nakomelingen 2e generatie Het dier is gedood na het einde van de proef.

Mogelijk surplus hypothyroidie Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Drachtige PTU moeders Het dier is gedood na het einde van de proef.

PTU continued, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

PTU transient dag 28, man Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

PTU continued, vrouw Het dier is gedood na het einde 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 die een goede beschrijving kan geven van (voorbijgaande) hypothyreoïdie op de verschillende orgaansystemen in het lichaam, en belangrijker nog, de interactie tussen deze organen.

Door een aantal verschillende vraagstellingen te combineren binnen 1 dierexperiment proberen wij het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te beperken. Eerdere experimenten lieten zien dat er een duidelijke ouder-afhankelijkheid is, waardoor de statistische eenheid uiteindelijk bij het moederdier ligt, en er dus geen twee dieren uit 1 nest tegelijkertijd kunnen worden opgeofferd. Wanneer bijvoorbeeld het vraagstuk over de voortplantingscapaciteit van de hypothyreoïde nakomelingen afzonderlijk zou moeten worden onderzocht, zouden wij dus 20 nieuwe hypothyreoïde moeders nodig, die ieder zo'n 10 hypothyreoïde nakomelingen geven waarvan wij er uiteindelijk dus maar 2 gebruiken (een mannetje en een vrouwtje). Door andere vraagstellingen nu te combineren met deze besparen wij vele proefdieren.

Voordelen van het parallel uitvoeren van experimenten met transient hypothyreoïde dieren en PTU hypothyreoïde dieren is de besparing van de euthyreoïde controlegroep. Eveneens geeft een groter aantal moederdieren meer speelruimte in de planning van de experimenten.

Een nadeel van fasering is dat een goede planning is vereist. Dit is ook de reden dat [REDACTED] en [REDACTED] zelf de planning zullen verzorgen opdat alle dieren optimaal benut zullen worden in een voor het personeel werkbaar schema.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008048.e (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Bronstcontrole man	1	02	1	25					01	1	1	1	3
Hypothyroid man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypothyroid vrouw	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Hypo moederdieren	1	02	1	30					01	4	1	2	2
Controle moederdieren	1	02	1	15					01	4	1	1	2
Controle man	1	02	1	60					01	4	1	2	1
Controle vrouw	1	02	1	60					01	4	1	1	1
Hypo moederdieren 1e generatie	1	02	1	20						01	4	1	2
Transient day 14, man	1	02	1	20					01	4	1	2	1
Transient day 28, man	1	02	1	21					01	4	1	2	1
PTU continued, man	1	02	1	15					01	4	1	3	1
Transient PTU day 28, man	1	02	1	40					01	4	1	3	1
Transient day 14, vrouw	1	02	1	20					01	4	1	1	1
Transient day 14, moeders	1	02	1	5					01	4	1	2	1
PTU moeders	1	02	1	11					01	4	1	2	2
PTU continued, vrouw	1	02	1	55					01	4	1	3	1
nakomelingen 2e generatie	1	02	1	30					01	4	1	3	2
Mogelijk surplus hypothyreoïdie	1	02	1	29						01	4	1	2
Drachtige PTU moeders	1	02	1	11					01	4	1	2	2

PTU continued, man	1	02	1	15	01	4	1	3	1
PTU transient dag 28, man	1	02	1	40	01	4	1	3	1
PTU continued, vrouw	1	02	1	55	01	4	1	3	2

Uw aanvraag 2008048.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC beoordeelt het algemene doel van de proef als belangrijk, maar heeft een aantal vragen en opmerkingen waarop ze een antwoord wil alvorens een definitief advies te geven.

De DEC vindt de beschrijving van de voorliggende proef erg complex. In de eerste plaats constateert zij dat een aantal verschillende doelen met de proef wordt beoogd. Om een goede afweging mogelijk te maken, verzoekt zij u puntsgewijs de doelstellingen van de verschillende onderdelen uit te schrijven.

Tevens verzoekt de DEC u de voordelen van het combineren in een proef van deze doelstellingen aan te geven en de voor- en nadelen van fasering van de proeven toe te lichten.

Daarnaast is het de DEC niet duidelijk, waarom u het onderzoek wilt uitbreiden met PTU-studies, terwijl u deze niet gereproduceerd krijgt.

Behalve voorgaande, principiële vragen heeft de DEC ook enkele (redactionele) vragen bij de opzet van de proef:

De DEC verzoekt u er bij vermelding van het aantal dieren (3. en 4.c.) rekening mee te houden, dat de pups die hypothyroïed geboren worden ook als proefdier moeten worden beschouwd, ook als ze worden afgevoerd/ geofferd.

Daarnaast verzoekt de DEC u eenduidiger aan te geven, hoe groot de groep is van transient mannen op dag 28: u geeft bij 3. (specificatie diergroepen) aan dat het om 21 ratten, terwijl bij 6.a. sprake is van 41 ratten.

Tevens verzoekt de DEC u bij 6.a. aan te geven waarom BrdU toedient (zoals vermeld bij 6.c.).

Bovendien verzoekt de DEC u meer kooiverrijking aan te bieden, bijv. in de vorm van een buisje of tunneltje.

Tenslotte verzoekt de DEC u in overweging te nemen de hartpunctie meteen uit te voeren na toediening van de narcose, zonder eerst de borstkas te openen, aangezien er een kans bestaat dat de dieren nog bijkomen (8. Toestand dieren na einde proef). Bovendien verzoekt de DEC u de laatste zin van 8. te wijzigen, aangezien de dieren tot 12 dagen oud worden gedecapiteerd zonder voorafgaande anesthesie.

Afhankelijk van uw reactie zal de proef door de kleine commissie worden behandeld, danwel door de voltallige DEC.

Uw aanvraag 2008048.b, 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 gering(/ matige) ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies verzoekt de DEC u de aantallen correct/ ondubbelzinnig aan te geven.

De DEC constateert de volgende onjuistheden/ onduidelijkheden: er is sprake van 25 of 30 hypothyroïde dieren, mogelijk door dubbeltelling van de transiënte dieren. Totaal aantal moederdieren wordt dan 56 of 61 en niet 66 zoals gesteld onder 6a. Daarvan krijgen 26 moederdieren (15+11) en niet 25 het controledieet (onder 6a). De rest, 30 of 35 krijgen het hypothyroïde dieet (en dus niet 41 zoals onder 6a). Het aantal dieren dat volgens het schema overblijft (buiten de dieren die wegvallen bij het reduceren van de nesten tot 12) is 19 + 10 (restant transiënt d14: 50-40).

Ingeval u bovengenoemde correcties onderkent, verzoekt de DEC u dit in het proefplan aan te passen, vergezeld van tekstuele toelichting.

Uw antwoorden zullen door de secretaris van de DEC worden afgehandeld.

Uw aanvraag 2008048.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 2008048.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Zoals zojuist besproken zet ik de proef op uw verzoek op te wijzigen. Gelieve de dieren die u wil aanvragen in het protocol aangeven, met de reden waarom deze extra dieren voor uw experiment nodig zijn. Graag ook in de mail bij het aanmelden toelichten waarom u de proef wil wijzigen.

Na aanmelding zal de proef afgehandeld worden door de kleine commissie.

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 aanvraag met aanmeldcode 2008048.d (titel: Effect van voorbijgaande en chronische hypothyreoïdie op de ontwikkeling en/of functioneren van de gonaden, lever, en schildklier) is aangemeld vanuit DRS.

Deze aanvraag is aangemaakt door: ██████████

Opmerkingen bij het aanmelden:

Beste ██████████,

██████████ heeft aanvraag 2008048c op wijzigen gezet op mijn verzoek. De proef loopt op dit moment, maar we hebben wat tegenslag gehad bij het drachtig maken van de dieren (is niet de eerste keer, een aantal jaren geleden hebben we ook een verminderde dracht gehad gedurende de zomermaanden).

Er zijn wat minder controle dieren drachtig geworden dan we hadden verwacht op grond van onze ervaring. Bovendien hadden we deze keer ook beduidend meer vrouwelijke dan mannelijke pups per nest (de afgelopen keren was het juist omgekeerd). Al met al hebben we niet voldoende mannelijke pups geboren uit moeders op controle dieet die direct na de geboorte met moeder overgezet konden worden op PTU (een stofje dat ook hypothyreoïdie induceert) - we hadden 55 pups moeten hebben en hadden er in werkelijkheid 35. Daar alle ingeplande groepen noodzakelijk waren voor het onderzoek, hebben we toen besloten dit onderdeel van de proef niet door te laten gaan. De surplus pups zijn ondertussen afgevoerd. Voor het publiceren van een van de artikelen van het proefschrift van ██████████ is het echter wel belangrijk dat de PTU proef alsnog wordt uitgevoerd. Ik zou daarom de DEC willen verzoeken om 11 drachtige ratten te mogen bestellen bij ██████████ (het aantal moederdieren zoals ook in de DEC aanvraag was aangegeven) en deze dieren na de partus gedurende 28 dagen op PTU te mogen zetten en daarna op controle voer. De dieren zullen op de in DEC aanvraag 2008048c aangegeven leeftijden worden geëuthaniseerd (proef kijkt dus niet af van de aanvraag waarvoor we reeds toestemming hebben gehad van de DEC).

In DEC aanvraag 2008048c hadden we aangegeven dat we de hypothyreoïde vrouwelijke dieren na het spenen zouden afvoeren. Echter overleg met een van onze studenten heeft afgelopen week laten zien dat er in de hypothyreoïde vrouwelijke pups die op dag 14 en 28 na de geboorte op normaal voer zijn overgezet, op dag 64 na de geboorte nog steeds blijvende veranderingen in het ovarium aanwezig zijn. Dit zou er op kunnen duiden dat zelfs een kortstondige blootstelling aan een tekort aan schildklierhormoon tijdens de foetale/neonatale periode al gevolgen kan hebben voor de ontwikkeling van eicellen en eventueel het nageslacht. We zouden daarom toestemming willen vragen om 14 vrouwelijke hypothyreoïde pups die op dag 14 op normaal voer zijn overgegaan en 14 hypothyreoïde vrouwelijke pups die op dag 28 op normaal voer zijn overgegaan, in leven te laten en te samen met 14 controle pups pas op respectievelijk dag 100 en 120 na de geboorte te euthaniseren.

De hierboven aangegeven veranderingen heb ik niet in de aanvraag zelf verwerkt omdat dit mogelijk, gezien de complexe opzet van de proef, tot verwarring kan leiden. Mochten er vragen zijn over de aangevraagde wijzigingen of andere onduidelijkheden, dan ben ik uiteraard graag bereid deze toe te lichten.

Met vriendelijke groet,

■

Uw aanvraag 2008048.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC verzoekt u duidelijker toe te lichten, waarom er 11 drachtige dieren moeten komen, aangezien het haar niet duidelijk is, waarom niet een deel van de proef al kon worden uitgevoerd met de beschikbare mannelijke dieren.

Daarnaast verzoekt de DEC u de wijzigingen te verwerken in het proefplan (zodanig, dat duidelijk is, dat het om een herhaling gaat).

Na beantwoording zal de proef opnieuw door de kleine commissie 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 2008048.e, 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