

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: De rol van Fiaf in de nieren, cisplatin studie

Aanmeldcode / Protocol: 2011040.a

Stadia van de proef:

09-03-2011	Aangemeld	
25-03-2011	Wijzigen	Secretaris van de DEC
25-03-2011	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd in het kader van een samenwerking tussen onze groep en een Amerikaanse onderzoeksgroep. De Amerikaanse groep heeft een langlopend onderzoeksproject naar de rol van Fiaf in de nieren dat via Amerikaanse instanties gefinancierd wordt. Het onderzoek pas binnen een lopend project van ons bij [REDACTED] waarin Fiaf centraal staat.

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

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

Fiaf is een door diverse weefsels uitgescheiden hormoon dat onder andere een rol speelt bij de vetstofwisseling. Recente onderzoeken van ons en buitenlandse collega's tonen aan dat Fiaf ook andere processen in het lichaam beïnvloedt. De laatste tijd is de interesse groeiende in een rol van Fiaf in de nieren. Onderzoek wat in samenwerking met ons (DEC 2010064.c en 2009101.c) recentelijk is gepubliceerd in het toptijdschrift Nature Medicine liet zien dat Fiaf de filterfunctie van de nieren beïnvloedt en lekkage van eiwit in de urine kan veroorzaken. Deze aanvraag heeft echter betrekking op een mogelijke rol van Fiaf bij een ander type nierziekte, namelijk acuut nierfalen. Nierfalen of nierinsufficiëntie beschrijft de situatie die ontstaat als de nieren niet of nauwelijks meer werken, met als gevolg verstoringen in vrijwel alle functies die normaal door een gezonde nier worden geregeld, zoals urineproductie en zuivering van het bloed van afvalstoffen.

Acuut nierfalen gaat gepaard met verhoging van het plasma gehalte aan vetten (triglyceriden) als gevolg van een gebrekkige klaring van vet-rijke deeltjes (triglyceride-rich lipoproteins) uit het bloed. Dat laatste wordt veroorzaakt door een verlaagde activiteit van het enzym dat verantwoordelijk is voor klaring van vetten uit het bloed: het lipoproteïne lipase. Wij en anderen hebben een aantal jaren geleden aangetoond dat Fiaf het lipoproteïne lipase remt en daardoor ook de klaring van vet-rijke deeltjes uit het bloed verlaagt. Om die reden is de hypothese ontstaan dat Fiaf mogelijk betrokken is bij de verstoring van de vetstofwisseling bij acuut nierfalen.

Een diermodel van acuut nierfalen dat door sommige onderzoekers wordt gebruikt is injectie van de stof cisplatin. Cisplatin is een chemotherapeutisch medicijn dat gebruikt wordt bij de behandeling van bepaalde vormen van kanker. Een neveneffect dat daarbij ontstaat is nierfalen. Amerikaanse onderzoekers (University of Arkansas) hebben gevonden dat cisplatin een verhoging in plasma gehalte aan Fiaf veroorzaakt. Tevens gaat de productie van Fiaf in de nieren omhoog, in het bijzonder in de

zogenaamde proximale tubulus. Tegelijkertijd zorgt cisplatin voor een verhoging van het vetgehalte in het bloed en remming van de activiteit van lipoproteïne lipase.

Om erachter te komen of Fiaf werkelijk verantwoordelijk is voor de verhoging in het vetgehalte in het bloed na cisplatin behandeling zijn experimenten met Fiaf knock-out muizen noodzakelijk.

Het doel van de proef is aldus om erachter te komen of Fiaf verantwoordelijk is voor bepaalde verschijnselen van acuut nierfalen, in het bijzonder het verhoogde vetgehalte in het bloed, in een specifiek diermodel van acuut nierfalen.

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

Acuut nierfalen beschrijft een snel optredende algemene verstoring in de werking van de nieren. Er zijn diverse oorzaken van acuut nierfalen aan te wijzen. Er wordt geschat dat 3-7% van de patienten die in het ziekenhuis worden opgenomen en 25-30% van de intensive care patienten hiermee te maken heeft.

Chronisch nierfalen komt ook veelvuldig voor en kan het gevolg zijn van diverse onderliggende problemen waaronder diabetes en hoge bloeddruk. Bij ernstige gevallen van nierfalen is dialyse of een niertransplantatie noodzakelijk. Nierfalen en de soms daaropvolgende nierdialyse gaan gepaard met verhoging van plasma lipiden, wat ervoor zorgt dat deze patienten een sterk verhoogd risico hebben om te komen overlijden aan hart en vaatziekten. Het doel van deze proef is om beter inzicht te krijgen in de relatie tussen nierfalen en de ontsparingen van de plasma lipiden, waaronder de triglyceriden.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 25-03-2011 tot 30-09-2011

3. Specificatie diergroepen:

wildtype cisplatin	8	muizen	wildtype C57Bl/6
Fiaf-KO cisplatin	8	muizen	Fiaf-KO op C57Bl/6 achtergrond
wildtype PBS	8	muizen	wildtype C57Bl/6
Fiaf-KO PBS	8	muizen	Fiaf-KO op C57Bl/6 achtergrond

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

16 mannelijke wildtype C57Bl/6 muizen en 16 mannelijke Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond zullen worden gebruikt in de leeftijd van 3-4 maanden. Fiaf knock-out missen een deel van het Fiaf gen waardoor ze geen functioneel Fiaf hormoon meer aanmaken. Wildtype C57Bl/6 muizen zijn afkomstig van interne fok binnen het [REDACTED]. Binnen diverse fokprogramma's (2010061.a en 2010060.a) worden wildtype C57Bl/6 muizen gegenereerd.

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

Om de rol van Fiaf te bestuderen zijn muizen die geen Fiaf aanmaken (zogenaamde knock out muizen) uitermate waardevol. Knock-outs van Fiaf zijn alleen gemaakt en beschikbaar in de muis.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Een perfecte statistische onderbouwing kan helaas niet gegeven worden vanwege gebrek aan informatie. In vorige studies waarin hetzelfde cisplatin diermodel is toegepast heeft men gebruik gemaakt van 8 dieren per groep. Dit aantal is ruim voldoende geweest om het effect van cisplatin statistisch te laten zien. Veel moeilijker in te schatten is het effect van Fiaf KO. Het beste kan een vergelijking worden gemaakt met DEC protocol 2009101.c en 2010064.c waarin proteinuria is opgewekt mbv. nephrotoxisch serum of lipopolysaccharide (LPS). Bij deze proef waren uiteindelijk 5-7 muizen per groep voldoende om een effect aan te tonen. De vergelijking is erg lastig wat in die gevallen betrof het een totaal andere vorm van nierschade. Omdat er risico bestaat op uitval van dieren vanwege het type interventie zal met in totaal 8 dieren per groep een voldoende aantal bereikt moeten zijn om het effect van Fiaf KO statistisch onderbouwd aan te tonen.

4.d. Herkomst:

wildtype cisplatin	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO cisplatin	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype PBS	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO PBS	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De Fiaf knock-out muizen zijn afkomstig van het proefdierbedrijf [REDACTED]. De muizen zijn via [REDACTED] geïmporteerd. Binnen het [REDACTED] is een colonie opgebouwd. Wildtype C57Bl/6 muizen zijn afkomstig van interne fok binnen het [REDACTED]. Binnen diverse fokprogramma's (2010061.a en 2010060.a) worden wildtype C57Bl/6 muizen gegenereerd.

5.a. Accommodatie:

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De muizen zullen na injectie met cisplatin drie maal daags worden geobserveerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/ of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht met meer dan 15% is afgenomen als gevolg van verminderd drinken en voerconsumptie. Op grond van eerdere experimenten is de verwachting echter dat de dieren zullen blijven eten en drinken.

5.c. Voeding:

De dieren ontvangen standaard chow. Gedurende de hele proef is voer en water ad libitum beschikbaar.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

Voor de proef zullen 16 mannelijke wildtype muizen en 16 mannelijke Fiaf knock-out muizen gebruikt worden in de leeftijd van 2-4 maanden. De helft van de dieren ontvangt een intraperitoneale injectie van cisplatin (20 mg/kg lichaamsgewicht), vanuit 3 mg/mL stock oplossing in PBS. De rest van de muizen krijgt alleen PBS met identiek volume. Deze eenmalige injectie zorgt voor een verhoging van bloed urea nitrogen (BUN) en creatinine die na 3 dagen een maximum bereikt. De dosis zorgt voor nephrotoxiciteit zonder dodelijk te zijn. Na 3 dagen zal onder isofluraan verdoving een orbitapunctie worden uitgevoerd om bloed te verzamelen. Vervolgens zullen de dieren worden opgeofferd via cervicale dislocatie. De nieren zullen worden verwijderd en onmiddellijk ingevroren. Tevens zal een deel worden verwerkt voor histologische technieken.

6.b. Mate van ongerief:

wildtype cisplatin	D. Matig/Ernstig
Fiaf-KO cisplatin	D. Matig/Ernstig
wildtype PBS	B. Gering/Matig
Fiaf-KO PBS	B. Gering/Matig

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

Die dieren die cisplatin krijgen geïnjecteerd ontwikkelen op termijn nierfalen. Uit de literatuur is gebleken dat de dosis cisplatin die we willen gebruiken na 3 dagen wel zal zorgen voor verhoging van klinische parameters van nierfalen (BUN, creatinine) maar niet dodelijk zal zijn.

Dieren die cisplatin toegediend krijgen:
 IP injectie cisplatin (start studie): gering/matig
 Effect cisplatin: matig/ernstig
 Orbitapunctie onder isofluraan verdoving: gering/matig
 Opoffering via cervicale dislocatie: gering
 Cumulatief: matig/ernstig

Dieren die geen cisplatin toegediend krijgen:
 IP injectie PBS (start studie): gering/matig
 Orbitapunctie onder isofluraan verdoving: gering/matig
 Opoffering via cervicale dislocatie: gering
 Cumulatief: gering/matig

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

Anesthesie:

wildtype cisplatin D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO cisplatin D. Is wel toegepast.
 wildtype PBS D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO PBS D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

wildtype cisplatin B. Wordt niet toegepast omdat dit onverenigbaar is met de proef.
 Fiaf-KO cisplatin B. Wordt niet toegepast omdat dit onverenigbaar is met de proef.
 wildtype PBS A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO PBS A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Duur van de proef wordt beperkt tot 3 dagen. Voor de proef is het echter essentieel dat de dieren nierfalen beginnen te ontwikkelen, wat met ongerief gepaard zal gaan.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

wildtype cisplatin Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO cisplatin Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 wildtype PBS Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO PBS Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

Aan het eind van de proef zullen de dieren worden opgeofferd voor verzameling bloed en diverse organen (o.a. nieren)

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

De invloed van nierfalen op lipidenwaarden in het bloed kan helaas niet nagebootst worden in een in vitro model. We kijken intussen met een groep uit [REDACTED] wel naar de regulatie van de productie van Fiaf door specifieke niercellen in kweek. Alhoewel deze experimenten heel nuttig zijn geven ze geen informatie over het belang van Fiaf bij bepaalde nierziekten. Daarvoor is het noodzakelijk de ziekte op te wekken in een diemodel waarbij door gebruik te maken van Fiaf knock-out muizen de specifieke rol van Fiaf kan worden bestudeerd.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2011040.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
wildtype cisplatin	1	01	1	8					01	4	2	4	1
Fiaf-KO cisplatin	2	01	1	8					01	4	2	4	1
wildtype PBS	1	01	1	8					01	4	1	2	1

Fiaf-KO PBS

2 01 1 8

01 4 1 2 1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: De rol van Fiaf in de nieren, cisplatin studie

Aanmeldcode / Protocol: 2011040.b

Stadia van de proef:

25-03-2011	Aangemeld	
01-04-2011	Wijzigen	Secretaris van de DEC
01-04-2011	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd in het kader van een samenwerking tussen onze groep en een Amerikaanse onderzoeksgroep. De Amerikaanse groep heeft een langlopend onderzoeksproject naar de rol van Fiaf in de nieren dat via Amerikaanse instanties gefinancierd wordt. Het onderzoek pas binnen een lopend project van ons bij [REDACTED] waarin Fiaf centraal staat.

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

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

Fiaf is een door diverse weefsels uitgescheiden hormoon dat onder andere een rol speelt bij de vetstofwisseling. Recente onderzoeken van ons en buitenlandse collega's tonen aan dat Fiaf ook andere processen in het lichaam beïnvloedt. De laatste tijd is de interesse groeiende in een rol van Fiaf in de nieren. Onderzoek wat in samenwerking met ons (DEC 2010064.c en 2009101.c) recentelijk is gepubliceerd in het toptijdschrift Nature Medicine liet zien dat Fiaf de filterfunctie van de nieren beïnvloedt en lekkage van eiwit in de urine kan veroorzaken. Deze aanvraag heeft echter betrekking op een mogelijke rol van Fiaf bij een ander type nierziekte, namelijk acuut nierfalen. Nierfalen of nierinsufficiëntie beschrijft de situatie die ontstaat als de nieren niet of nauwelijks meer werken, met als gevolg verstoringen in vrijwel alle functies die normaal door een gezonde nier worden geregeld, zoals urineproductie en zuivering van het bloed van afvalstoffen.

Acuut nierfalen gaat gepaard met verhoging van het plasma gehalte aan vetten (triglyceriden) als gevolg van een gebrekkige klaring van vet-rijke deeltjes (triglyceride-rich lipoproteins) uit het bloed. Dat laatste wordt veroorzaakt door een verlaagde activiteit van het enzym dat verantwoordelijk is voor klaring van vetten uit het bloed: het lipoproteïne lipase. Wij en anderen hebben een aantal jaren geleden aangetoond dat Fiaf het lipoproteïne lipase remt en daardoor ook de klaring van vet-rijke deeltjes uit het bloed verlaagt. Om die reden is de hypothese ontstaan dat Fiaf mogelijk betrokken is bij de verstoring van de vetstofwisseling bij acuut nierfalen.

Een diemodel van acuut nierfalen dat door sommige onderzoekers wordt gebruikt is injectie van de stof cisplatin. Cisplatin is een chemotherapeutisch medicijn dat gebruikt wordt bij de behandeling van bepaalde vormen van kanker. Een neveneffect dat daarbij ontstaat is nierfalen. Amerikaanse onderzoekers (University of Arkansas) hebben gevonden dat cisplatin een verhoging in plasma gehalte aan Fiaf veroorzaakt. Tevens gaat de productie van Fiaf in de nieren omhoog, in het bijzonder in de

zogenaamde proximale tubulus. Tegelijkertijd zorgt cisplatin voor een verhoging van het vetgehalte in het bloed en remming van de activiteit van lipoproteïne lipase.

Om erachter te komen of Fiaf werkelijk verantwoordelijk is voor de verhoging in het vetgehalte in het bloed na cisplatin behandeling zijn experimenten met Fiaf knock-out muizen noodzakelijk.

Het doel van de proef is aldus om erachter te komen of Fiaf verantwoordelijk is voor bepaalde verschijnselen van acuut nierfalen, in het bijzonder het verhoogde vetgehalte in het bloed. Hierbij maken we gebruik van een specifiek diemodel van acuut nierfalen, namelijk cisplatin injectie. De bevindingen zullen niet alleen waardevol zijn om de veranderingen in vetstofwisseling te begrijpen als gevolg van toediening cisplatin in kankerpatienten en het daardoor optredende nierfalen, maar geven tevens inzicht in de pathofysiologie van verstoorde vetstofwisseling bij acuut nierfalen in bredere zin. We denken dat de bevindingen grotendeels vertaalbaar zullen zijn naar acuut nierfalen in bredere zin maar men moet altijd realiseren dat het hier om een diemodel gaat dat de pathologie in de mens nooit exact weergeeft.

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

Acuut nierfalen beschrijft een snel optredende algemene verstoring in de werking van de nieren. Er zijn diverse oorzaken van acuut nierfalen aan te wijzen. Er wordt geschat dat 3-7% van de patienten die in het ziekenhuis worden opgenomen en 25-30% van de intensive care patienten hiermee te maken heeft. Chronisch nierfalen komt ook veelvuldig voor en kan het gevolg zijn van diverse onderliggende problemen waaronder diabetes en hoge bloeddruk. Bij ernstige gevallen van nierfalen is dialyse of een niertransplantatie noodzakelijk. Nierfalen en de soms daaropvolgende nierdialyse gaan gepaard met verhoging van plasma lipiden, wat ervoor zorgt dat deze patienten een sterk verhoogd risico hebben om te komen overlijden aan hart en vaatziekten. Het doel van deze proef is om beter inzicht te krijgen in de relatie tussen nierfalen en de ontsparingen van de plasma lipiden, waaronder de triglyceriden.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 26-03-2011 tot 30-09-2011

3. Specificatie diergroepen:

wildtype cisplatin	8	muizen	wildtype C57Bl/6
Fiaf-KO cisplatin	8	muizen	Fiaf-KO op C57Bl/6 achtergrond
wildtype PBS	6	muizen	wildtype C57Bl/6
Fiaf-KO PBS	6	muizen	Fiaf-KO op C57Bl/6 achtergrond

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

14 mannelijke wildtype C57Bl/6 muizen en 14 mannelijke Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond zullen worden gebruikt in de leeftijd van 3-4 maanden. Fiaf knock-out missen een deel van het Fiaf gen waardoor ze geen functioneel Fiaf hormoon meer aanmaken. Wildtype C57Bl/6 muizen zijn afkomstig van interne fok binnen het [REDACTED]. Binnen diverse fokprogramma's (2010061.a en 2010060.a) worden wildtype C57Bl/6 muizen gegenereerd. Het cisplatin model is in principe in zowel mannetjes als vrouwtjes muizen toepasbaar. Er zijn geen redenen bekend bij ons waardoor we zouden kunnen verwachten dat het effect van Fiaf KO verschillend is tussen mannetjes en vrouwtjes muizen. Er is voor mannelijke muizen gekozen om het aantal te gebruiken dieren te beperken. Er is geen reden om aan te nemen dat de resultaten sexe afhankelijk zijn zullen.

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

Om de rol van Fiaf te bestuderen zijn muizen die geen Fiaf aanmaken (zogenaamde knock out muizen) uitermate waardevol. Knock-outs van Fiaf zijn alleen gemaakt en beschikbaar in de muis.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Een perfecte statistische onderbouwing kan helaas niet gegeven worden vanwege gebrek aan informatie.

In vorige studies waarin hetzelfde cisplatin diemodel is toegepast heeft men gebruik gemaakt van 8 dieren per groep. Dit aantal is ruim voldoende geweest om het effect van cisplatin statistisch te laten zien. Veel moeilijker is om in te schatten hoeveel dieren er nodig zijn om een eventueel effect van Fiaf KO op diverse parameters aan te tonen. Het beste kan een vergelijking worden gemaakt met DEC protocol 2009101.c en 2010064.c waarin proteinuria is opgewekt mbv. nephrotoxisch serum of lipopolysaccharide (LPS). Bij deze proef waren uiteindelijk 5-7 muizen per groep voldoende om een effect aan te tonen. De vergelijking is erg lastig want in die gevallen betrof het een totaal andere vorm van nierschade. Omdat er risico bestaat op uitval van dieren vanwege het type interventie zal met in totaal 8 dieren per groep een voldoende aantal bereikt moeten zijn om het effect van Fiaf KO statistisch onderbouwd aan te tonen. Voor de groepen die enkel PBS krijgen geïnjecteerd kan met een geringer aantal dieren worden volstaan aangezien de variatie in die groepen beperkt zal zijn.

4.d. Herkomst:

wildtype cisplatin	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO cisplatin	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype PBS	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO PBS	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De Fiaf knock-out muizen zijn afkomstig van het proefdierbedrijf [REDACTED]. De muizen zijn via [REDACTED] geïmporteerd. Binnen het [REDACTED] is een colonie opgebouwd. Wildtype C57Bl/6 muizen zijn afkomstig van interne fok binnen het [REDACTED]. Binnen diverse fokprogramma's (2010061.a en 2010060.a) worden wildtype C57Bl/6 muizen gegenereerd.

5.a. Accommodatie:

Omdat de verschillende muizen uit verschillende nesten afkomstig zijn is het niet mogelijk bestaande nesten in stand te houden. De dieren zullen daarom na de injectie van PBS/cisplatin individueel gehuisvest worden.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De muizen zullen na injectie met cisplatin drie maal daags worden geobserveerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/ of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht met meer dan 15% is afgenomen als gevolg van verminderd drinken en voerconsumptie. Op grond van eerdere experimenten is de verwachting echter dat de dieren zullen blijven eten en drinken.

5.c. Voeding:

De dieren ontvangen standaard chow. Gedurende de hele proef is voer en water ad libitum beschikbaar

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

Voor de proef zullen 14 mannelijke wildtype muizen en 14 mannelijke Fiaf knock-out muizen gebruikt worden in de leeftijd van 2-4 maanden. 8 wildtype en 8 Fiaf knock-out muizen ontvangen een intraperitoneale injectie van cisplatin (20 mg/kg lichaamsgewicht), vanuit 3 mg/mL stock oplossing in PBS. De rest van de muizen (6 wildtype en 6 Fiaf knock-out muizen) krijgt alleen PBS met identiek volume. Deze eenmalige injectie zorgt voor een verhoging van blood urea nitrogen (BUN) en creatinine die na 3 dagen een maximum bereikt. De dosis zorgt voor nephrotoxiciteit zonder dodelijk te zijn. Na 3 dagen zal onder isofluraan verdoving een orbitapunctie worden uitgevoerd om bloed te verzamelen. Vervolgens zullen de dieren worden opgeofferd via cervicale dislocatie. De nieren zullen worden verwijderd en onmiddellijk ingevroren. Tevens zal een deel worden verwerkt voor histologische technieken.

6.b. Mate van ongerief:

wildtype cisplatin	D. Matig/Ernstig
Fiaf-KO cisplatin	D. Matig/Ernstig
wildtype PBS	B. Gering/Matig
Fiaf-KO PBS	B. Gering/Matig

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

Die dieren die cisplatin krijgen geïnjecteerd ontwikkelen op termijn nierfalen. Uit de literatuur is gebleken dat de dosis cisplatin die we willen gebruiken na 3 dagen wel zal zorgen voor verhoging van klinische parameters van nierfalen (BUN, creatinine) maar niet dodelijk zal zijn

Dieren die cisplatin toegediend krijgen:

IP injectie cisplatin (start studie): gering/matig

Effect cisplatin: matig/ernstig

Orbitapunctie onder isofluraan verdoving: gering/matig

Opoffering via cervicale dislocatie: gering

Cumulatief: matig/ernstig

Dieren die geen cisplatin toegediend krijgen:

IP injectie PBS (start studie): gering/matig

Orbitapunctie onder isofluraan verdoving: gering/matig

Opoffering via cervicale dislocatie: gering

Cumulatief: gering/matig

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

Anesthesie:

wildtype cisplatin	D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO cisplatin	D. Is wel toegepast.
wildtype PBS	D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO PBS	D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

wildtype cisplatin	B. Wordt niet toegepast omdat dit onverenigbaar is met de proef.
Fiaf-KO cisplatin	B. Wordt niet toegepast omdat dit onverenigbaar is met de proef.
wildtype PBS	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO PBS	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Duur van de proef wordt beperkt tot 3 dagen. Voor de proef is het echter essentieel dat de dieren nierfalen beginnen te ontwikkelen, wat met ongerief gepaard zal gaan.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

wildtype cisplatin	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Fiaf-KO cisplatin	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
wildtype PBS	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Fiaf-KO PBS	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

Aan het eind van de proef zullen de dieren worden opgeofferd voor verzameling bloed en diverse organen (o.a. nieren)

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

De invloed van nierfalen op lipidenwaarden in het bloed kan helaas niet nagebootst worden in een in vitro model. We kijken intussen met een groep uit [REDACTED] wel naar de regulatie van de productie van Fiaf door specifieke niercellen in kweek. Alhoewel deze experimenten heel nuttig zijn geven ze geen informatie over het belang van Fiaf bij bepaalde nierziekten. Daarvoor is het noodzakelijk de ziekte op te wekken in

een diermodel waarbij door gebruik te maken van Fiaf knock-out muizen de specifieke rol van Fiaf kan worden bestudeerd. Nierfalen gaat helaas gepaard met enig ongerief. Omdat nierfalen centraal staat in de onderzoeksvraagstelling kan het als zodanig niet vermeden worden.

Door het aantal dieren in de controle groepen (wildtype PBS en Fiaf-KO PBS) beperkt te houden wordt een vermindering van het totaal aantal dieren bereikt.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2011040.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
wildtype cisplatin	1	01	1	8					01	4	2	4	1
Fiaf-KO cisplatin	2	01	1	8					01	4	2	4	1
wildtype PBS	1	01	1	6					01	4	1	2	1
Fiaf-KO PBS	2	01	1	6					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: De rol van Fiaf in de nieren, cisplatin studie

Aanmeldcode / Protocol: 2011040.c

Stadia van de proef:

01-04-2011	Aangemeld		
04-04-2011	Positief advies na behandeling DEC		Secretaris van de DEC
08-04-2011	Proef gestart		
08-04-2011	Proef beëindigd		
11-04-2011	Welzijnsevaluatie aangemaakt		
11-04-2011	Welzijnsevaluatie aangemeld		
19-04-2011	Welzijnsevaluatie goedgekeurd		

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd in het kader van een samenwerking tussen onze groep en een Amerikaanse onderzoeksgroep. De Amerikaanse groep heeft een langlopend onderzoeksproject naar de rol van Fiaf in de nieren dat via Amerikaanse instanties gefinancierd wordt. Het onderzoek pas binnen een lopend project van ons bij [redacted] waarin Fiaf centraal staat.

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

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

Fiaf is een door diverse weefsels uitgescheiden hormoon dat onder andere een rol speelt bij de vetstofwisseling. Recente onderzoeken van ons en buitenlandse collega's tonen aan dat Fiaf ook andere processen in het lichaam beïnvloedt. De laatste tijd is de interesse groeiende in een rol van Fiaf in de nieren. Onderzoek wat in samenwerking met ons (DEC 2010064.c en 2009101.c) recentelijk is gepubliceerd in het toptijdschrift Nature Medicine liet zien dat Fiaf de filterfunctie van de nieren beïnvloedt en lekkage van eiwit in de urine kan veroorzaken. Deze aanvraag heeft echter betrekking op een mogelijke rol van Fiaf bij een ander type nierziekte, namelijk acuut nierfalen. Nierfalen of nierinsufficiëntie beschrijft de situatie die ontstaat als de nieren niet of nauwelijks meer werken, met als gevolg verstoringen in vrijwel alle functies die normaal door een gezonde nier worden geregeld, zoals urineproductie en zuivering van het bloed van afvalstoffen.

Acuut nierfalen gaat gepaard met verhoging van het plasma gehalte aan vetten (triglyceriden) als gevolg van een gebrekkige klaring van vet-rijke deeltjes (triglyceride-rich lipoproteins) uit het bloed. Dat laatste wordt veroorzaakt door een verlaagde activiteit van het enzym dat verantwoordelijk is voor klaring van vetten uit het bloed: het lipoproteïne lipase. Wij en anderen hebben een aantal jaren geleden aangetoond dat Fiaf het lipoproteïne lipase remt en daardoor ook de klaring van vet-rijke deeltjes uit het bloed verlaagt. Om die reden is de hypothese ontstaan dat Fiaf mogelijk betrokken is bij de verstoring van de vetstofwisseling bij acuut nierfalen.

Een diermodel van acuut nierfalen dat door sommige onderzoekers wordt gebruikt is injectie van de stof

cisplatin. Cisplatin is een chemotherapeutisch medicijn dat gebruikt wordt bij de behandeling van bepaalde vormen van kanker. Een neveneffect dat daarbij ontstaat is nierfalen. Amerikaanse onderzoekers (University of Arkansas) hebben gevonden dat cisplatin een verhoging in plasma gehalte aan Fiaf veroorzaakt. Tevens gaat de productie van Fiaf in de nieren omhoog, in het bijzonder in de zogenaamde proximale tubulus. Tegelijkertijd zorgt cisplatin voor een verhoging van het vetgehalte in het bloed en remming van de activiteit van lipoproteïne lipase. Om erachter te komen of Fiaf werkelijk verantwoordelijk is voor de verhoging in het vetgehalte in het bloed na cisplatin behandeling zijn experimenten met Fiaf knock-out muizen noodzakelijk. Het doel van de proef is aldus om erachter te komen of Fiaf verantwoordelijk is voor bepaalde verschijnselen van acuut nierfalen, in het bijzonder het verhoogde vetgehalte in het bloed. Hierbij maken we gebruik van een specifiek diemodel van acuut nierfalen, namelijk cisplatin injectie. De bevindingen zullen niet alleen waardevol zijn om de veranderingen in vetstofwisseling te begrijpen als gevolg van toediening cisplatin in kankerpatienten en het daardoor optredende nierfalen, maar geven tevens inzicht in de pathofysiologie van verstoorde vetstofwisseling bij acuut nierfalen in bredere zin. We denken dat de bevindingen grotendeels vertaalbaar zullen zijn naar acuut nierfalen in bredere zin maar men moet altijd realiseren dat het hier om een diemodel gaat dat de pathologie in de mens nooit exact weergeeft.

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

Acuut nierfalen beschrijft een snel optredende algemene verstoring in de werking van de nieren. Er zijn diverse oorzaken van acuut nierfalen aan te wijzen. Er wordt geschat dat 3-7% van de patienten die in het ziekenhuis worden opgenomen en 25-30% van de intensive care patienten hiermee te maken heeft. Chronisch nierfalen komt ook veelvuldig voor en kan het gevolg zijn van diverse onderliggende problemen waaronder diabetes en hoge bloeddruk. Bij ernstige gevallen van nierfalen is dialyse of een niertransplantatie noodzakelijk. Nierfalen en de soms daaropvolgende nierdialyse gaan gepaard met verhoging van plasma lipiden, wat ervoor zorgt dat deze patienten een sterk verhoogd risico hebben om te komen overlijden aan hart en vaatziekten. Het doel van deze proef is om beter inzicht te krijgen in de relatie tussen nierfalen en de ontsporingen van de plasma lipiden, waaronder de triglyceriden.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 02-04-2011 tot 30-09-2011

3. Specificatie diergroepen:

wildtype cisplatin	8	muizen	wildtype C57Bl/6
Fiaf-KO cisplatin	8	muizen	Fiaf-KO op C57Bl/6 achtergrond
wildtype PBS	6	muizen	wildtype C57Bl/6
Fiaf-KO PBS	6	muizen	Fiaf-KO op C57Bl/6 achtergrond

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

14 mannelijke wildtype C57Bl/6 muizen en 14 mannelijke Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond zullen worden gebruikt in de leeftijd van 3-4 maanden. Fiaf knock-out missen een deel van het Fiaf gen waardoor ze geen functioneel Fiaf hormoon meer aanmaken. Wildtype C57Bl/6 muizen zijn afkomstig van interne fok binnen het [REDACTED]. Binnen diverse fokprogramma's (2010061.a en 2010060.a) worden wildtype C57Bl/6 muizen gegenereerd. Het cisplatin model is in principe in zowel mannetjes als vrouwtjes muizen toepasbaar. Er zijn geen redenen bekend bij ons waardoor we zouden kunnen verwachten dat het effect van Fiaf KO verschillend is tussen mannetjes en vrouwtjes muizen. Er is voor mannelijke muizen gekozen om het aantal te gebruiken dieren te beperken. Er is namelijk wel een systematisch verschil tussen mannetjes en vrouwtjes. Inclusie van vrouwelijke dieren vergroot aldus de variatie waardoor een groter aantal proefdieren nodig is. Dit past niet in het kader van het verminderen van het aantal proefdieren. Vanuit wetenschappelijk oogpunt is een gemengde groep mannetjes en vrouwtjes geen verstandige keuze. Een aparte groep mannetjes en vrouwtjes drukt het aantal proefdieren nog verder omhoog.

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

Om de rol van Fiaf te bestuderen zijn muizen die geen Fiaf aanmaken (zogenaamde knock out muizen) uitermate waardevol. Knock-outs van Fiaf zijn alleen gemaakt en beschikbaar in de muis.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Een perfecte statistische onderbouwing kan helaas niet gegeven worden vanwege gebrek aan informatie. In vorige studies waarin hetzelfde cisplatin diersmodel is toegepast heeft men gebruik gemaakt van 8 dieren per groep. Dit aantal is ruim voldoende geweest om het effect van cisplatin statistisch te laten zien. Veel moeilijker is om in te schatten hoeveel dieren er nodig zijn om een eventueel effect van Fiaf KO op diverse parameters aan te tonen. Het beste kan een vergelijking worden gemaakt met DEC protocol 2009101.c en 2010064.c waarin proteinuria is opgewekt mbv. nephrotoxisch serum of lipopolysaccharide (LPS). Bij deze proef waren uiteindelijk 5-7 muizen per groep voldoende om een effect aan te tonen. De vergelijking is erg lastig want in die gevallen betrof het een totaal andere vorm van nierschade. Omdat er risico bestaat op uitval van dieren vanwege het type interventie zal met in totaal 8 dieren per groep een voldoende aantal bereikt moeten zijn om het effect van Fiaf KO statistisch onderbouwd aan te tonen. Voor de groepen die enkel PBS krijgen geïnjecteerd kan met een geringer aantal dieren worden volstaan aangezien de variatie in die groepen beperkt zal zijn.

4.d. Herkomst:

wildtype cisplatin	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO cisplatin	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype PBS	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO PBS	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De Fiaf knock-out muizen zijn afkomstig van het proefdierbedrijf [REDACTED]. De muizen zijn via [REDACTED] geïmporteerd. Binnen het [REDACTED] is een colonie opgebouwd. Wildtype C57Bl/6 muizen zijn afkomstig van interne fok binnen het [REDACTED]. Binnen diverse fokprogramma's (2010061.a en 2010060.a) worden wildtype C57Bl/6 muizen gegenereerd.

5.a. Accommodatie:

Omdat de verschillende muizen uit verschillende nesten afkomstig zijn is het niet mogelijk bestaande nesten in stand te houden. De dieren zullen daarom na de injectie van PBS/cisplatin individueel gehuisvest worden.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De muizen zullen na injectie met cisplatin drie maal daags worden geobserveerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/ of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht met meer dan 15% is afgenomen als gevolg van verminderd drinken en voerconsumptie. Op grond van eerdere experimenten is de verwachting echter dat de dieren zullen blijven eten en drinken.

5.c. Voeding:

De dieren ontvangen standaard chow. Gedurende de hele proef is voer en water ad libitum beschikbaar.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

Voor de proef zullen 14 mannelijke wildtype muizen en 14 mannelijke Fiaf knock-out muizen gebruikt worden in de leeftijd van 2-4 maanden. 8 wildtype en 8 Fiaf knock-out muizen ontvangen een intraperitoneale injectie van cisplatin (20 mg/kg lichaamsgewicht), vanuit 3 mg/mL stock oplossing in PBS. De rest van de muizen (6 wildtype en 6 Fiaf knock-out muizen) krijgt alleen PBS met identiek volume. Deze eenmalige injectie zorgt voor een verhoging van bloed urea nitrogen (BUN) en creatinine die na 3 dagen een maximum bereikt. De dosis zorgt voor nephrotoxiciteit zonder dodelijk te zijn. Na 3 dagen zal onder isofluraan verdoving een orbitapunctie worden uitgevoerd om bloed te verzamelen. Vervolgens zullen de dieren worden opgeofferd via cervicale dislocatie. De nieren zullen worden verwijderd en onmiddellijk ingevroren. Tevens zal een deel worden verwerkt voor histologische technieken.

6.b. Mate van ongerief:

wildtype cisplatin	D. Matig/Ernstig
Fiaf-KO cisplatin	D. Matig/Ernstig
wildtype PBS	B. Gering/Matig
Fiaf-KO PBS	B. Gering/Matig

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

Die dieren die cisplatin krijgen geïnjecteerd ontwikkelen op termijn nierfalen. Uit de literatuur is gebleken dat de dosis cisplatin die we willen gebruiken na 3 dagen wel zal zorgen voor verhoging van klinische parameters van nierfalen (BUN, creatinine) maar niet dodelijk zal zijn

Dieren die cisplatin toegediend krijgen:

IP injectie cisplatin (start studie): gering/matig

Effect cisplatin: matig/ernstig

Orbitapunctie onder isofluraan verdoving: gering/matig

Opoffering via cervicale dislocatie: gering

Cumulatief: matig/ernstig

Dieren die geen cisplatin toegediend krijgen:

IP injectie PBS (start studie): gering/matig

Orbitapunctie onder isofluraan verdoving: gering/matig

Opoffering via cervicale dislocatie: gering

Cumulatief: gering/matig

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

Anesthesie:

wildtype cisplatin	D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO cisplatin	D. Is wel toegepast.
wildtype PBS	D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO PBS	D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

wildtype cisplatin	B. Wordt niet toegepast omdat dit onverenigbaar is met de proef.
Fiaf-KO cisplatin	B. Wordt niet toegepast omdat dit onverenigbaar is met de proef.
wildtype PBS	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO PBS	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Duur van de proef wordt beperkt tot 3 dagen. Voor de proef is het echter essentieel dat de dieren nierfalen beginnen te ontwikkelen, wat met ongerief gepaard zal gaan.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

wildtype cisplatin	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Fiaf-KO cisplatin	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
wildtype PBS	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
Fiaf-KO PBS	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

Aan het eind van de proef zullen de dieren worden opgeofferd voor verzameling bloed en diverse organen (o.a. nieren)

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

De invloed van nierfalen op lipidenwaarden in het bloed kan helaas niet nagebootst worden in een in vitro model. We kijken intussen met een groep uit [REDACTED] wel naar de regulatie van de productie van Fiaf door specifieke niercellen in kweek. Alhoewel deze experimenten heel nuttig zijn geven ze geen informatie over het belang van Fiaf bij bepaalde nierziekten. Daarvoor is het noodzakelijk de ziekte op te wekken in een diermodel waarbij door gebruik te maken van Fiaf knock-out muizen de specifieke rol van Fiaf kan worden bestudeerd. Nierfalen gaat helaas gepaard met enig ongerief. Omdat nierfalen centraal staat in de onderzoeksvraagstelling kan het als zodanig niet vermeden worden.

Door het aantal dieren in de controle groepen (wildtype PBS en Fiaf-KO PBS) beperkt te houden wordt een vermindering van het totaal aantal dieren bereikt.

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

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2011040.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
wildtype cisplatin	1	01	1	8					01	4	2	4	1
Fiaf-KO cisplatin	2	01	1	8					01	4	2	4	1
wildtype PBS	1	01	1	6					01	4	1	2	1
Fiaf-KO PBS	2	01	1	6					01	4	1	2	1

Uw aanvraag 2011040.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC onderschrijft het wetenschappelijke belang van de proef, maar heeft een aantal inhoudelijke vragen ter verheldering waarop ze een antwoord wil alvorens tot een definitieve afweging te komen. Het gaat om de volgende vragen en opmerkingen:

Het is de DEC niet helemaal duidelijk, wat de reikwijdte is van de voorliggende proef. De titel suggereert, dat het gaat om de rol van Fiaf bij nierfalen in algemene zin, maar in de uitwerking richt u zich op de specifieke situatie van nierfalen als gevolg van toediening van Cisplatin bij kankerpatiënten. Ook bij 1.b. geeft u in de laatste zin aan, dat de proef gericht is op het verkrijgen van inzicht in de relatie tussen nierfalen en de ontsporingen van plasmalipiden. De DEC verzoekt u dit te verhelderen en in geval het doel een bredere focus heeft dan met Cisplatin behandelde kankerpatiënten aan te geven, in hoeverre de resultaten te vertalen zijn naar natuurlijk nierfalen.

Bovendien verzoekt de DEC u bij 4.a. toe te lichten, waarom er alleen mannelijke dieren worden gebruikt.

Daarnaast verzoekt de DEC u bij 4.c. (toelichting aantal dieren) het aantal dieren per proefgroep uitvoeriger te onderbouwen. U geeft aan dat bij een vorige, vergelijkbare proef 8 dieren ruim voldoende was. Dit zegt echter niets over de vraag, of het ook met minder dieren kan. Bovendien gaat de DEC er van uit, dat de variatie bij de PBS-groepen kleiner is en dat hierbij dus met minder dieren kan worden volstaan.

Tevens verzoekt de DEC u bij 5.b. de huisvesting te beschrijven.

Tenslotte verzoekt de DEC u bij 9. (alternatieven) ook in te gaan op vermindering en verfijning.

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

Uw aanvraag 2011040.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de KC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten maximaal matig/ernstige ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies heeft de DEC een vraag, waar ze graag een antwoord op wil, alvorens tot een definitief advies te komen.

U geeft aan, dat het geslacht niet uitmaakt in effect. In dat geval is er volgens de DEC geen reden om alleen mannetjes te nemen. Het gebruik van beide sexen vermindert fokoverschotten. De DEC verzoekt u hierop uw visie te geven.

Na beantwoording zal de proef door de secretaris van de DEC in overleg met de proefdierdeskundige worden afgehandeld.

Uw aanvraag 2011040.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de KC de status: 'Positief advies na behandeling DEC' gekregen.

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

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC