

Datum ontvangst DEC: 9-9-2005

DEC nr:

1981

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO**AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

[Redacted]

[Redacted]

E-mail: [Redacted] of [Redacted]

Telefoon: [Redacted] / fax: [Redacted]

Instituut:**ALGEMEEN**

1. **Titel van het onderzoeksplan:** Transcriptoom en proteoom analyse van quercetine blootgestelde colon mucosa

Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

Benefit-Risk evaluation of flavonoids in foods and their use as functional food ingredients

(NWO projectnr. 014-12-012)

2. **Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):** [Redacted]

E-mail adres onderzoeker: [Redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: [Redacted]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [Redacted]

Externe samenwerking (indien van toepassing): mogelijke samenwerking met het RIKILT en Wageningen Universiteit & Reasearch Centre

2. **Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:** 03-10-2005

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail:

[Redacted])

Geplande duur van het onderzoeksplan: 14 weken inclusief 3 weken acclimatisatieperiode

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO

4. **Codenummers volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:**

groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A. Controle (basisvoer)	1	02	2	6	30	1	1	01	01	1	1	1	1
B. 10,000 ppm quercetine	1	02	2	6	30	1	1	01	01	1	1	1	1

RELEVANTIE**5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:**

De vraag die beantwoord zou moeten worden met deze dierproef luidt als volgt:

welke transcriptoom en proteoom veranderingen in de darm mucosa zijn betrokken in het beschermend effect dat quercetine biedt op de vorming van darmtumoren?

Eerder is door ons een experiment uitgevoerd aan de Wageningen universiteit, waaruit bleek dat toediening van quercetine leidt tot afname van de incidentie aan colontumoren onder carcinogeen behandelde dieren. Aanvankelijk was het de bedoeling om transcriptoom analyse te doen op het colon RNA van deze dieren. Echter, door tot nog toe onduidelijke redenen is het colon RNA afgebroken. Omdat het van belang is om te weten welke mechanismen betrokken zijn in het beschermend effect dat quercetine heeft op de vorming van darmtumoren, willen wij nu in een korte dierproef (11 weken, zonder chemische inductie van colon tumoren) alsnog bovengenoemde vraag beantwoorden. Het uitvoeren van deze dierproef, zonder inductie van colon kanker, staat bovendien model voor de gezonde mens die quercetine binnen krijgt door consumptie van groenten en fruit.

Met behulp van transcriptomics en proteomics zou deze aanpak inzicht moeten geven in de biologische processen die veranderen in de gezonde darm mucosa door quercetine verrijking in het dieet.

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:**Maatschappelijk en wetenschappelijk belang:**

Darmkanker is na longkanker bij mannen en borstkanker bij vrouwen, de meest voorkomende kankersoort. Wereldwijd komen er jaarlijks 1.000.000 nieuwe colon kanker patiënten bij en overlijden er 530.000. Op grond van epidemiologisch onderzoek bestaat het vermoeden dat er voedingscomponenten zijn die mogelijk een rol spelen bij de preventie van colonkanker, waaronder flavonoïden die o.a. voorkomen in groenten en fruit. Een van de meest bestudeerde flavonoïden is quercetine, die bescherming geeft tegen darmkanker in dierexperimenten. Het beoogde experiment staat als model voor de gezonde mens die quercetine bevattende groenten consumeert ter preventie van chronische ziekten, w.o. (colon-) kanker. Met dit experiment kan inzicht worden verkregen in mechanismen die aangezet worden door flavonoïden - met quercetine als model flavonoid -, met als resultaat bescherming colon kanker. Door de holistische benadering die transcriptomics en proteomics bieden, kunnen nieuwe biomarkers geïdentificeerd worden, die voorheen niet in verband werden gebracht met darmgezondheid, en reeds bestaande markers gevalideerd worden. Mede hierdoor kan inzicht verkregen worden in de biologische processen die ten grondslag liggen aan een verstoorde darmgezondheid.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Deze proef is wetenschappelijk goedgekeurd door de promotie commissie, in het kader van het promotie onderzoek van de aanvrager.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET**8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):**

- ☒ nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DEC-advies nr.:
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
 - wettelijke eis:
 - testrichtlijn:

- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz.

Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaardprotocol voor de nadere uitwerking.

Week -3 t/m 11: eens in de twee weken wegen van de ratten

Week -3 t/m 0: acclimatisatie

Week 0 t/m 11: de helft van de dieren krijgt quercetine verrijkt voer en de andere helft het basisvoer.

Week 11: anesthesie met 70%CO₂/30%O₂, verbloeding via aorta, en uiteindelijk verwijderen van het colon.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A.	Controle dieet (basisvoer)	Idem als hieronder	4 + 2 reserve + 1 voor pilot; totaal : n = 7	Man
B.	Dieet verrijkt met 10,000 ppm quercetine	3 wkn. acclimatisatie, eens in de 2 weken wegen en voerinname bepalen, na 11 weken op het quercetine dieet gezeten te hebben, worden de ratten eerst verdoofd, vervolgens verbloed via de aorta, waarna het colon wordt verwijderd en geschraapt.	4 + 2 reserve + 1 voor pilot; totaal : n = 7	Man

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard protocol:

In totaal 12 dieren, op grond van:

- de statistiek die vereist is voor de "omics" technieken om de verwachte variatie uit te middelen: $n \geq 4$ dieren per groep [K. Verhoeckx *et al.* Proteomics 2004, p. 1014-1018 en M. van Erk *et al.* Eur J Nutr 2004, p. 143-156]
- verkrijgen van voldoende en kwalitatief goed RNA voor transcriptomics
- verkrijgen van voldoende eiwit voor proteomics

Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

Per groep zullen 2 reserve ratten meegenomen worden, om onverhoopt vroegtijdige uitval op te vangen. Deze groep van in totaal 4 reserve dieren zullen dezelfde handelingen ondergaan als de eigenlijke dieren en daarom ook samen gehuisvest worden. Als er geen ratten vroegtijdig uitvallen, zullen de 4 reservedieren aan het eind van de proef ook opgeofferd worden, zodat de keuzemogelijkheid voor de beste RNA/eiwit kwaliteit vergroot wordt.

Verder is een pilot vereist met 2 dieren, om na te gaan wat de beste opwerk- en fixatiemethode is om goed RNA te verkrijgen.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING**12. Welke diersoort, en welke ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:****Welke sexe wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:**

Het betreft mannetjes F344 ratten, omdat dit een vaak gebruikt model is voor darmkanker en ook is gehanteerd tijdens de vorige dierproef in Wageningen.

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☒ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, **n.l.:**
- ☐ overcomplete dieren
- ☐ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, **n.l.:**

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- ☒ euthanasie
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, **n.l.:**

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedsysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Standaard huisvesting, per 2 dieren in macrolonbakken met bedding. Voer en water *ad libitum*.

ONGERIEF**16. Beschrijf de aard van het ongerief:**

Geef hierbij, gespecificeerd per handeling of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

De mate van ongerief is gering, gezien de beperkte handelingen die verricht worden: bepaling diergewicht, dieet interventie en euthanasie.

17. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):

Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief		Duur van het ongerief			
		< 1 dag	1-7 dagen	7-30 dagen	> 30 dagen
Mate van ongerief	A: gering				12
	B: gering/matig				
	C: matig				
	D: matig/ernstig				
	E: ernstig				
	F: zeer ernstig				

Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Mocht onverhoopt blijken dat er dieren zijn die tekenen vertonen van een verminderde gezondheid, dan zullen deze vroegtijdig opgeofferd worden.

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, danwel voortijdig gedood?

Criteria die aangehouden worden om proefdieren vroegtijdig op te offeren zijn o.a.: verminderde voerinname, afgenomen lichaamsgewicht en afgenomen vitaliteit.

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Er worden geen bijkomende risico's voorzien veroorzaakt door quercetine, mede op grond van de literatuur en de voorgaande dierproef die in Wageningen is uitgevoerd: zowel de voerinname, diergewichten en vitaliteit waren vergelijkbaar met die van controle dieren die het basisvoer kregen toegediend.

ALTERNATIEVEN**21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?**

Er zijn geen alternatieven mogelijk voor deze proef.

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Uit eerder uitgevoerde *in vitro* (Caco-2/HT-29) experimenten op TNO en Wageningen bleek dat quercetine pro-carcinogeen zou zijn, terwijl het merendeel van de literatuur en ons eigen colonkanker experiment te Wageningen aangeeft dat quercetine anti-carcinogeen is in de rat. Het *in vitro* systeem heeft technische beperkingen, mede omdat het quercetine metabolisme in dit model niet vergelijkbaar is met *in vivo* metabolisme en daardoor een tegengesteld effect teweeg brengt.

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
- ☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel [REDACTED])
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- ☐ elders, n.l.:
- ☒ zo nee; waarom niet: zie vraag 21

ANDERE ASPEKTEN**23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?**

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

Geen

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

onderzoeker

(adj) hoofd afdeling

datum:

datum:

Na behandeling:
secretaris DEC