

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

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

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

E-mail: [redacted]

telefoon: [redacted] / fax: [redacted]

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: Evaluation of acute whole-body response to metabolic glucose stress in healthy versus obese insulin resistant C57Bl/6 mice.

1.2. studienummer:

1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [redacted] (art. 9); [redacted] (art. 9)

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [redacted] / [redacted]

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

Externe samenwerking (indien van toepassing):

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: Zsm na goedkeuring DEC aanvraag

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

[redacted])

Geplande duur van het onderzoeksplan: 12 weeks

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Low fat diet (10%)	1	01	1	51	33	1	1	01	01	1	1	3	1
High fat diet (45%)	1	01	1	51	33	1	1	01	01	1	1	3	1

RELEVANTIE

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

- Which molecular events and which whole body stress responses are elicited by an acute metabolic (dietary) challenge (bolus of glucose)?
- What is the time course of the events that are induced?
- In which way does a healthy (C57Bl/6 mice on low fat diet) organism differ in its response when compared to a diseased, insulin resistant organism (C57Bl/6 mice on a high fat diet)?.

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

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier

Besides the rapidly increasing prevalence of overweight and obesity due to chronic overnutrition combined with a lack of exercise, postprandial hyperglycemia is an independent risk factor for cardiovascular disease. The STP-NIDDM trial (JAMA 2003; 290: 486-494) showed that the development of hypertension and cardiovascular events can be reduced if postprandial hyperglycemia is treated. But why postprandial hyperglycemia is so detrimental still is enigmatic. It is also unclear how high glucose intake can induce such harmful effects especially when metabolic dysregulation (metabolic syndrome, impaired glucose tolerance, insulin resistance) is present.

There is an urgent need for improved understanding and awareness of the role of metabolic dysregulation and glucose-mediated activation of oxidative and inflammatory pathways, which subsequently may lead to novel treatment options to prevent vascular and metabolic diseases.

Glucose tolerance tests (GTT) under basal and insulin resistant conditions provide an ideal starting point to gain first insights into the regulatory pathways underlying the adaptive mechanisms to handle glucose challenges under healthy and well-defined disease conditions (insulin resistance).

Therefore we treated in this study 2 groups of mice for 12 weeks with a fat-containing diet. The first group, receiving a low fat diet, does not develop insulin resistance and is called "healthy". The second group, receiving a high fat diet, becomes obese and develops insulin resistance. Both groups will be challenged with a bolus of glucose (metabolic challenge) and the whole body response (i.e. in all relevant tissues) will be assessed over time by combining advanced Systems biology with a chronobiological study design.

This approach will provide novel insight into the underlying events during metabolic dietary challenges (bolus of glucose) and will identify the mechanisms (pathways, genes, processes) by which a healthy organism can cope with such a challenge. Comparison with insulin resistant littermates of the same age will allow us to identify what processes are impaired or dysfunctional in the disease status.

6.a.2 Economisch belang

6.a.3 Milieu belang

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

6.b Wetenschappelijk belang:

General relevance: GTTs are the prime readout of the degree of insulin resistance in experimental studies. It is unclear why there is such a great inter-animal variability in the response to glucose. Better insight into the underlying events during the time course of the GTT may help to improve and optimize this test (e.g. reducing animal numbers).

Preliminary studies assessing the response to a bolus of glucose in our mouse models have demonstrated that we are able to execute such type of metabolic challenge tests at a very high technical level (reproducibility, minimal dropout rate, etc).

We have also observed that upon glucose challenge in a glucose tolerance test (GTT), lipid metabolism is affected and plasma lipids decrease (about 1-3 days after the challenge; data from a preliminary lipidomics analysis), and that an acute phase reaction of the liver is evoked (about 3 days after the challenge).

This clearly points to a cross-talk between metabolism, inflammation and lipids. However, we do not understand the molecular basis and the dynamics of this intriguing phenomenon. This project will help to dissect the pathways, genes and proteins that couple metabolic stress/homeostasis to inflammatory stress/homeostasis and to oxidative stress/homeostasis.

This study aims at identifying the regulatory mechanisms required to absorb metabolic glucose stress. The data to

be obtained will provide first insights into how the metabolic, the oxidative and the inflammatory homeostasis are interrelated with each other and how an organism adapts to glucose stress.

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? Het studieplan is opgesteld in nauw overleg tussen ervaren wetenschappelijke medewerkers van TNO-KvL en een consortium van Europese onderzoekers (5 Europese onderzoekscentra). Het project en studieplan is opgesteld binnen het [REDACTED] en het project werd gereviewed door een panel van voedingsdeskundigen en goedgekeurd door [REDACTED], een internationale commissie.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

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

- ☒ nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- ☐ 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 standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

Mice:

Male C57Bl/6 animals (age 3 weeks) will be bought and will be allowed to accommodate at the TNO facility until the age of 12 weeks. Then, animals will be matched in 2 experimental groups of each n=51 (n=45 for challenge and omics analysis; n=6 extra for a reference sacrifice time point at t=4 weeks), primarily based on their initial plasma lipid levels and taking into account their body weight.

Animals will be housed with n=3/cage to minimize stress as discussed with [REDACTED] and as specified in van Loo *et al.*, Male management: coping with aggression in male laboratory mice, *Laboratory animals*, 2003, review).

Dietary treatment and plasma sampling:

Animals will be treated with a well-defined control low fat diet (10% fat; LF group) or a high fat diet (45% fat; HF group) to induce obesity and insulin resistance (IR). Animals will receive the diet for 12 weeks. The diets to be used are established diets [REDACTED] and will be used in several parallel studies in other European Centers. This allows us to compare the results of the various studies at the participating study centers.

Blood samples will be collected in EDTA at t=0, 4, 8 and 12 weeks of diet feeding. Preferably, about 100 µl EDTA blood will be taken per time point to determine plasma cholesterol, triglycerides, glucose, insulin, adiponectin, fibrinogen, SAA, ALAT and plasma lipidomics/metabolomics.

Body weight and food intake will be monitored at regular intervals during the experimental period (at t=0, 4, 8, 12 weeks).

Note: The 6 extra mice per group, that will be sacrificed after t=4 weeks, are necessary for comparing this study with another short-term challenge study which will be executed in [REDACTED]. This allows us to exchange tissues and data between the study centers, which ultimately saves animals.

Challenge protocol and sacrifice procedure:

At the end of the experimental treatment period (12 weeks), the animals will be subjected to a defined fasting period (5 h; from 8 a.m. to 1 p.m.), and subsequently be challenged with a single i.p. injection of glucose conform a standard glucose tolerance test (GTT) protocol essentially as in DEC 2159. The dose of glucose will be 2 g per kg body weight. (The volume of the glucose preparation to be injected will be adjusted individually to correct for differences in body weight).

The glucose injection will take place at 1 p.m. for all animals. (For feasibility reasons, this will be done at two days and animals will randomly selected for day 1 or 2.)

After injection of glucose, groups of n= 9 mice each will be sacrificed at in total 5 time points: t=0, 40 min, 2 h, 18 h and 48 h after glucose injection.

At these time points, the animals will be sacrificed using CO/CO₂ (no anesthesia to avoid confounding effects of the anesthetics because also the neuroendocrine system including brain will be analyzed). The tissues specified below will be collected rapidly according to an established procedure. Tissues will be snap-frozen in liquid nitrogen.

Tissues to be collected:

At sacrifice, adipose depots (gonadal, visceral), heart, liver, muscle, intestine, aorta and brain are collected. Plasma/serum will be collected by heart puncture.

The way of collecting tissues is of very high importance for the outcome of the study since high quality mRNA is a requisite for proper transcriptomics analysis.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	geen	bloedafname via staartsnede of – staarttip of na euthanasie (CO ₂) via hartpunctie	200	M/V
2	geen	euthanasie dmv CO ₂	20	M/V

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 studieplan:

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.

In dit experiment willen we meer inzicht krijgen in de onderliggende processen die gedurende een glucose challenge (GTT-tijdreeks) afspelen. Daarom injecteren we elke muis met dezelfde hoeveelheid glucose en analyseren we de genexpressie-profielen in de verschillende weefsels en de plasmaveranderingen middels metabolomics/lipidomics.

In de afgelopen jaren hebben we vergelijkbare OMICs studies uitgevoerd. De ervaring leert dat een groepsgrootte van n=9 per tijdstip - zoals in dit experiment voorgesteld – nodig is om voldoende hoogwaardig mRNA te isoleren (7 van de 9 isolaties voldoen aan de eisen van de geavanceerde Affymetrix genechips) en om een verschil van +/- 10% in genexpressie significant te detecteren. N=9 dieren is ook voldoende om een (=goed gepowerde) multivariate metabolomics/lipidomics analyse uit te voeren.

Om deze dierproef te kunnen vergelijken met een dierproef aan de [REDACTED] die op de short-term effecten van high fat feeding (= 4 weken feeding van verschillende doseringen high fat) gericht is, willen we per dieet groep 6 dieren extra gebruiken (dus totaal 12 extra dieren), die ook met n=3/cage gehuisvest worden. Middels deze dieren kunnen we data van ons experiment vergelijken met het experiment in [REDACTED] en het is dan ook niet nodig om delen van de [REDACTED] studie te herhalen wat uiteindelijk dieren bespaart.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

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.

Mannelijke C57Bl/6 muizen (leeftijd ca. 3 weken) zodat ze nog bij elkaar gezet kunnen worden.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

X aangekocht van proefdierfokker

O aangekocht elders, n.l.:

O overcomplete dieren

O eigen fok

O reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)

O anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

☒ euthanasie ten behoeve van de proef

O euthanasie na afloop van de proef

O gebruik voor een volgende proef

O andere vergunninghouder

O 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.

Groepshuisvesting in macrolon bakken (n=3 muizen/bak zoals besproken met [REDACTED] en zoals gespecificeerd in van Loo *et al.*, Male management: coping with aggression in male laboratory mice, *Laboratory animals*, 2003, review).

Voer en water ad lib. Kooiverrijking.

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.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1-2	51	vet-verrijkt voer	> 30 dagen	1
1-2	51	5 uur vasten	1-7 dagen	2
1-2	51	Wegen	1-7 dagen	1
1-2	51	Bloedafnames	1-7 dagen	3
1-2	51	Ip glucose injectie	< 1 dag	2
1-2	51	Terminatie CO2	< 1 dag	2

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.

- 4 Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandelings-effect.
Gebruik de codering:
Code 1: gering
Code 2: gering/matig
Code 3: matig
Code 4: matig/ernstig
Code 5: ernstig
Code 6: zeer ernstig
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- 6 Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-2	51	2

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Stress-/ pijnbestrijding voor de hier toegepaste biotechnische handelingen is niet wenselijk i.v.m. de analyse van het neuroendocriene systeem, hormonen en de hersenen; daarom is gekozen voor het opofferen na behandeling (euthanasie) met CO₂.

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

Criteria procedures proefdieren #16, *Euthanasie bij proefdieren*

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.

Dat is onwaarschijnlijk omdat we al eerder vergelijkbare dierexperimenten hebben uitgevoerd zonder dat er bijzonderheden waren opgetreden. Daarnaast zijn de mensen met artikel 9 en 12 goed getraind en hebben veel ervaring met het proefdierwerk.

ALTERNATIEVEN

21. 21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef? Voor de complexe biologische processen bestaan op dit moment nog geen *in vitro* alternatieven.

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

Bij de reactie op een dieet bolus glucose en de absorptie van deze 'energiestoot' zijn zeer veel verschillende weefsels en celtypen betrokken. Voor de studie van dergelijke complexe interacties zouden *in vitro* alternatieven tekortschieten.

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, wij houden ons zelf op de hoogte van de ontwikkelingen op dit gebied.

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 verdere aspecten.

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

APOE*3 apolipoproteïne E3

HF-dieet High Fat dieet

[REDACTED]
Onderzoeker

datum: 29 november 2007

[REDACTED]
Manager Operations

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker.