

Datum ontvangst DEC: 7 januari 2011

DEC nr: 3068

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO**AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

Dit formulier dient voor de uiterste inzendtermijn (zie Spider, cluster onderzoekers Art.9) volledig ingevuld **elektronisch** in het bezit te zijn van:

E-mail: [redacted]

Postadres:

Secretariaat DEC en proefdierdeskundige

[redacted]

[redacted]

telefoon: [redacted] (secretariaat) [redacted] (proefdierdeskundige)

Kerngebied en locatie: [redacted]
[redacted]

ALGEMEEN**1. Onderzoeksplan**

1.1. **titel:** Het effect van een veranderd lipide profiel op de ontwikkeling van artrose in een APOE*3Leiden.CETP model

1.2. **studienummer:-**

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** [redacted] Models, Mechanisms and Markers for patient stratification

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

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

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

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

[redacted] (art. 12)

Externe samenwerking (indien van toepassing): -

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 01-04-2011

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

Geplande duur van het onderzoeksplan: 9-10 maanden

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [redacted] (afhankelijk van wanneer de dierfaciliteit in [redacted] wordt geopend)

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	2	01	1	24	33	1	1	01	01	1	1	3	1
2	2	01	1	24	33	1	1	01	01	1	1	3	1
3	2	01	1	34	33	1	1	01	01	1	1	3	1
4	2	01	1	24	33	1	1	01	01	1	1	3	1
5	2	01	1	24	33	1	1	01	01	1	1	3	1
2-5Low responders	2	01	1	36	33	1	1	01	01	1	1	1	1

RELEVANTIE

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

Traditioneel werd in het onderzoek naar artrose vooral de focus gelegd op het kraakbeen. Defecten in het kraakbeen leiden tot langzame bot deformatie en uiteindelijke ernstige artrose. In het huidige onderzoek wordt echter de ziekte steeds vaker bekeken als een feature van het metabool syndroom. Het metabool syndroom is een profiel van zeer frequente aandoeningen waaronder een hoge bloeddruk, verhoogde triglycerides, een hoge BMI en verhoogd cholesterol. Wanneer men minimaal 3 kenmerken bevat spreekt men van het metabool syndroom. Uit epidemiologisch onderzoek is gebleken dat het hebben van artrose is geassocieerd met een 5.26x verhoogd risico op het metabool syndroom.

Een van de kenmerken van het metabool syndroom is obesitas. In een voorgaande studie (de [REDACTED] studie DEC nr. 2634) hebben we het effect van obesitas (38 weken hoog vet dieet) op de ontwikkeling van artrose bestudeerd in een humane CRP transgene muis. Bij deze studie zijn 2 interventies gedaan met anti-inflammatoire effecten; rosuvastatine en rosiglitazone. De behandelde groepen lieten een aanzienlijk verminderde artrose ontwikkeling zien en daarnaast werden inflammatoire markers onderdrukt. Tevens werd aangetoond dat er geen verband was tussen het gewicht van de muizen en de ontwikkeling van artrose. Dit effect werd vooral gezien in mannelijke huCRPtg muizen terwijl vrouwen geen heftige artrose ontwikkelde. Het geslachtsverschil kon in deze studie niet verklaard worden.

Naast het hebben van metabool syndroom is ook bewezen dat patiënten met artrose een hoger risico hebben om cardiovasculaire ziekten te ontwikkelen. Zo is gebleken dat er een lineaire associatie is tussen de ernst van hand artrose en arteriosclerosis in vrouwen en ook liet onderzoek zien dat atheromateous vasculair disease gekoppeld is met de progressie tot artrose. Artrose patiënten lieten verhoogde serum cholesterol levels zien ten opzichte van gezonde personen. Naast veranderde cholesterol-levels waren ook vetzuren en arachidonic acid levels significant verhoogd. Uit deze studies is gebleken dat een veranderd lipide metabolisme is betrokken bij de ontwikkeling van artrose, maar verdere details hiervan zijn onbekend.

In deze studie willen wij onderzoek doen naar de rol van het lipide metabolisme op de ontwikkeling van artrose. De APOE*3Leiden.CETP muis is binnen TNO al goed gekarakteriseerd wat betreft

arterosclerose ontwikkeling en lipid metabolisme en een geschikt model om een veranderd lipide profiel op de ontwikkeling van artrose te bestuderen. Het voordeel van dit model is dat er geen mechanische invloeden (overgewicht) of experimentele handelingen (meniscus sectie) aan te pas komen. Er is echter wel gebleken dat mannetjes en vrouwtjes zeer verschillend reageren op een dieet met cholesterol, waardoor een studie in beide geslachten noodzakelijk zal zijn. Door middel van interventie met een plantenstanol (dit voorkomt de opname van LDL uit de darm in het bloed) zal bekeken worden of een verlaging van serum cholesterol levels invloed heeft op de ontwikkeling van artrose. Daarnaast zal een interventie met atorvastatine worden toegepast wat ook tot cholesterol verlaging zal leiden, maar in tegenstelling tot plantenstanol ook een anti-inflammatoire werking heeft. Door beide interventies los van elkaar toe te passen zal het belang van zowel het lipide als de inflammatoire component in dit model bestudeerd worden.

Samenvattend is de studie opgezet om de volgende vragen te beantwoorden:

- 1) Wat is de invloed van een veranderd lipide metabolisme op de ontwikkeling van artrose?
 - Kunnen we onderscheid maken tussen chow dieet, laag cholesterol en hoog cholesterol dieet?
 - Wat is de invloed van geslacht?
- 2) Leidt een lipideverlagende interventie (met en zonder anti-inflammatoire effecten) tot een onderdrukking van de artrose ontwikkeling in de muizen op een hoog cholesterol dieet?

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

Artrose (het engelse osteoarthritis of OA) of kraakbeenslijtage is één van de meest voorkomende ouderdomsaandoeningen. Tien procent van de 60-plussers heeft chronische pijn en gewrichtsdeformaties vanwege OA en is daardoor ernstig gehinderd in het dagelijks functioneren. Mede door de vergrijzing en de toename van metabool syndroom zal het aantal patiënten de komende jaren sterk groeien. Helaas is er momenteel geen geneesmiddel beschikbaar tegen OA en patiënten worden voornamelijk behandeld met pijnstillers. OA staat hierdoor in de top-5 van kosten voor de gezondheidszorg in Europa. Zowel vanuit patiënten als vanuit economisch perspectief is er dus een grote behoefte aan nieuwe geneesmiddelen. In dit kader wordt artrose in het WHO rapport over 'Priority Medicine' ook specifiek benoemd als ziekte waarvoor het ontwikkelen van biomarkers en therapieën essentieel is. De ziekte wordt gekenmerkt door een heterogene ontwikkeling, waardoor de uitkomsten van klinische trials moeilijk interpreteerbaar zijn. De stratificatie van de patiënten in verschillende subklassen zal bijdragen in het onderzoek naar nieuwe therapieën en behandelingen.

6.a.2 Economisch belang

Het chronische karakter van OA en de toenemende mate van invaliditeit die daarmee gepaard gaat brengen relatief hoge kosten met zich mee, die uiteenvallen in de directe medische kosten en daarnaast de indirecte kosten als gevolg van (gedeeltelijke) arbeidsongeschiktheid. De 'Bone and Joint Decade' (een WHO initiatief om de kwaliteit van leven van mensen met aandoeningen aan het bewegingsapparaat te verbeteren) geeft aan dat: '...The economic consequences of osteoarthritis are

enormous, for example, it is rated the highest cause of work loss in USA, despite being a condition that causes most problems to populations after retirement age...'

6.a.3 Milieu belang

nvt

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

Het chronische progressieve karakter van OA is in toenemende mate belastend (zowel fysiek als psychisch) voor zowel patiënt als directe omgeving (familie/verzorgers).

6.b Wetenschappelijk belang:

In de laatste tien jaar heeft TNO [REDACTED] grote expertise opgebouwd op een aantal ziektegebieden, waaronder ontstekingsziekten, gewrichtsaandoeningen (artrose en reuma), fibrose, hart- en vaatziekten (atherosclerose) en neurologische aandoeningen. Deze kennis is mede gestoeld op een groot aantal *in vitro* en *in vivo* ziektemodellen, die momenteel worden toegepast om ziektemechanismen op te helderen, om nieuwe geneesmiddelen te testen in samenwerking met farmaceutische en biotechnologie bedrijven, en om eigen ziekte targets te ontwikkelen en patenteren. Binnen TNO hebben we de mogelijkheid om door middel van de APOE*3Leiden.CETP muis de invloed van veranderde lipide profielen op de ontwikkeling van artrose te onderzoeken.

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

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat? Het protocol is opgesteld na overleg met deskundigen op het gebied van artrose binnen het consortium van [REDACTED] en binnen TNO op het gebied van de APOE*3Leiden muis.

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?

Deze studie heeft een looptijd van 42 weken (waarvan 4 weken inloop) en wordt uitgevoerd met 83 mannelijke en 83 vrouwelijke volwassen APOE*3Leiden.CETP transgene muizen. De muizen uit

de controle groep (groep 1) zullen standaard chow dieet krijgen (n=24: 12 mannen/12 vrouwen). De andere muizen (n=142: 71 mannen/71 vrouwen) zullen op western type diet (WTD; 15% verzadigd vet) met low cholesterol (0.1-0.2%) worden gezet. Elke 3-4 weken wordt het lichaamsgewicht en de voerinname bepaald.

Op t=0 weken wordt 70µl bloed afgenomen via staartincisie (na 4 uur vasten). Low-responders (muizen met een laag plasma cholesterol gehalte, na voeding met WTD low cholesterol, waarschijnlijk vanwege een lage E*3Leiden expressie) worden uit het experiment verwijderd. Dit zullen naar verwachting 36 muizen (25%) zijn.

De andere muizen op WTD low cholesterol worden gematched op grond van plasma cholesterol, triglyceriden en gewichten en leeftijd en verdeeld in 4 groepen:

- 2) WTD low cholesterol (n=24: 12 mannen/12 vrouwen, leeftijd 12 weken)
- 3) WTD high cholesterol (0.5-1%*) (n=34: 17 mannen/17 vrouwen, leeftijd 12 weken)
- 4) WTD high cholesterol plus 0.0018% w/w atorvastatine (2mg/kg b.w./day) (n=24: 12 mannen/12 vrouwen, leeftijd 12 weken)
- 5) WTD high cholesterol plus plantenstanolen (n=24: 12 mannen/12 vrouwen, leeftijd 12 weken)

*Cholesterol concentratie wordt zodanig aangepast dat mannen en vrouwen dezelfde serum levels cholesterol zullen krijgen. De precieze concentratie zal bepaald worden aan de hand van huidige studies en zal voor aanvang van de studie aan de DEC worden gemeld.

Op t=4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 en 38 weken wordt weer (70µl) bloed afgenomen na 4 uur vasten. Op t=0, 8, 16, 24, 32, 36 en 38 weken zal tevens 'spot' urine worden verzameld. Dit zal gebeuren door de dieren op te tillen en de urine te verzamelen. In deze urine samples zullen kraakbeen/bot afbraak markers bepaald worden. Op t=28 weken wordt een pilot opoffering van 10 muizen (5 mannen/5 vrouwen) uit de WTD high cholesterol groep uitgevoerd om de hoeveelheid artrose en arteriosclerose te bepalen en om te kijken hoe lang de studie nog zal worden voortgezet. Aan het einde van de studie (t=38 of een eerder tijdstip) worden de muizen geëuthaniseerd met behulp van CO₂ en wordt een hartpunctie gedaan om serum te verzamelen. Beide achterpootjes worden gebruikt voor histologische en CT-scan analyses. De hoeveelheid artrose ontwikkeling zal worden bepaald. Het hart, de aorta en de lever zullen tevens verzameld worden voor o.a. arteriosclerose metingen. In de serum samples zullen o.a. lipide en inflammatoire markers gemeten worden.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	Chow dieet	Wegen, bloedafnames (11x), 4h vasten (11x), urine verzameling (7x) euthanasie mbv CO ₂ en sectie	24	M/V
2	WTD low cholesterol	idem	24	M/V

3	WTD high cholesterol	N=24: Wegen, bloedafnames (11x), 4h vasten (11x), urine verzameling (7x) euthanasie mbv CO ₂ en sectie N=10: Wegen, bloedafnames (8x), 4h vasten (8x), urine verzameling (5x) euthanasie mbv CO ₂ en sectie	34	M/V
4	WTD high cholesterol + atorvastatine	Wegen, bloedafnames (11x), 4h vasten (11x), urine verzameling (7x) euthanasie mbv CO ₂ en sectie	24	M/V
5	WTD high cholesterol + plantenstanolen	idem	24	M/V
2-5	Low-responders	Wegen (1x), bloedafname (1x), 4h vasten (1x), euthanasie mbv CO ₂	36	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:

In totaal worden 166 APOE*3Leiden.CETP mannen en vrouwen gebruikt voor de studie. De groepsgrootte (24/groep: 12 mannen/12 vrouwen) is gebaseerd op een powerberekening met een betrouwbaarheid van 80% en een verschil van minimaal 25%. De spreiding is gekozen op basis van artrose ontwikkeling in een vorige studie (dec nr 2634).

Uit experimenten is gebleken dat 25% low-responders bij de APOE*3Leiden.CETP muizen te verwachten zijn. Daarom worden 166 muizen aangevraagd om 130 muizen in de studie te kunnen opnemen (4 groepen van 24 muizen en 1 groep van 34 muizen).

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

Muis, APOE*3Leiden.CETP (op C57Bl/6 achtergrond) vrouwen en mannen, 8-12 weken

Als diersoort wordt de muis gebruikt omdat de APOE*3Leiden.CETP muis goed gekarakteriseerd is m.b.t. het lipiden metabolisme en de ontwikkeling van arteriosclerose. Er worden zowel mannetjes als vrouwtje gebruikt omdat deze zeer verschillend reageren op dieetveranderingen en ontwikkeling van artrose en arteriosclerose

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☐ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☐ overcomplete dieren
- ☒ 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:

X 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?

Groepshuisvesting van maximaal 5 muizen per kooi in macrolon bakken met kooiverrijking.

Voer en water ad lib.

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
1-5	130	4 uur vasten	8-11 x	1
1-5	130	Bloedafname uit de staart	8-11 x	3
1-5	130	Urine verzameling	5-7 x	2
1-5	130	artrose symptomen	0-30 weken	1-3
2-5Low-responders	36	4 uur vasten	1x	1
2-5Low-responders	36	Bloedafname uit staart	1x	1
Alle groepen	166	Euthanasie dmv CO ₂	1x	1

Toelichting:

- Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 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).
- Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandel-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
1-5	130	3
2-5Low-responders	36	1

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

Bij bloedafname via de staart wordt geen anesthesie toegepast omdat dit meer belastend wordt geacht dan de bloedafname zelf. Verder wordt geen pijnbestrijding toegepast.

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

Er worden geen ernstige effecten in de deze proef verwacht, maar bij onverwachte tekenen van ziekte (gewichtsafname > 20%, pilo erectie, afscheiding rond de ogen) wordt bij deze dieren voortijdig euthanasie toegepast.

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

Uit voorgaande dierexperimenten bij TNO (atorvastatine, plantenstanolen) is gebleken dat bij de gebruikte dosering geen bijkomende risico's zijn te verwachten.

ALTERNATIEVEN

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

Niet mogelijk

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:

Gezien de complexiteit van het lipidenmetabolisme en de invloed op artrose ontwikkeling kan dit alleen worden onderzocht in intacte diermodellen en bestaan er geen alternatieve methoden om deze complexe metabole processen te onderzoeken.

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: Intern is advies gevraagd (o.a. [REDACTED] en er is overleg geweest over de ontwikkelingen in het diermodel.

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.

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

E3L.CETP: APOE*3Leiden.Cholesteryl Ester Transfer Protein transgene muis
WTD: Western Type Diet
OA: OsteoArthritis/artrose
LDL: Low-Density Lipoprotein
WHO: World Health Organization
BMI: Body Mass Index

Onderzoeker [REDACTED]
PhD Student

Management

datum:

datum:

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