

Datum ontvangst DEC: 25 januari 2011
15 maart 2011 final

2011-2
afstemmingsoverzocht
DEC nr: 3075 spoed

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:

E-mail: [redacted]

telefoon: [redacted]

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: Evaluation of anti-inflammatory test compounds on inflammasome activity in high fat diet treated mice: a pilot study

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]

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

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

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

Externe samenwerking (indien van toepassing):

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: Na goedkeuring DEC aanvraag (Q1 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: 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
Prevention setting													
groups													
P1-chow	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	2	1
P2a HFD (i.p.)	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	2	1
P2b HFD (gavage)	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1
P3 HFD+ cmpd 1	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1
P4 HFD+cmpd 2	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1
P5 HFD+ cmpd 3	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1
Intervention setting													
groups													

I1 chow	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	2	1
I2a HFD (i.p.)	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	2	1
I2b HFD (gavage)	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	2	1
I3 HFD+ cmpd 1	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1
I4 HFD+cmpd 2	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1
I5 HFD+ cmpd 3	1	01	1	5	33	1	1	01	01	1	1	3	1

RELEVANTIE

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

High fat diet feeding evokes metabolic inflammation in several tissues, thereby promoting the development of insulin resistance and type 2 diabetes. Activation of a multiprotein complex termed the 'inflammasome' plays a crucial role in inducing inflammation.

In this pilot study, we will evaluate which anti-inflammatory compound is most effective in reducing the activity of the inflammasome. Two conditions are of interest: a) prevention of the activation of the inflammasome and b) de-activation of the inflammsome once it is already active.

Specific questions are thus:

1. Which anti-inflammatory compound is most effective in preventing high fat diet-induced activation of the inflammasome (prevention setting)?
2. Which anti-inflammatory compound is most effective in switching off an already active inflammasome (intervention setting)?
3. Is a prevention strategy or an intervention strategy more effective in quenching the inflammasome?

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

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is the most important health threat in Western societies and responsible for high mortality and morbidity rates. In the Netherlands the total number of patients is estimated to be about 1 Million patients and every year about 70,000 new patients are diagnosed. Current therapeutic strategies are directed at lowering plasma glucose levels and have only limited success. Patients cannot be cured and treatment of plasma glucose appears to be treatment of an epiphenomenon instead of treatment of the real cause (S. Kahn, New England Journal of Medicine, 2008). A novel strategy to treat DM2 involves the reduction of metabolic inflammation which is thought to be a major driver of disease development. Metabolic inflammation is a result of metabolic overload, for instance when too much dietary fat and carbohydrates are consumed.

There are currently no drugs available to treat or diminish metabolic inflammation. Treatment of metabolic inflammation in a setting of DM2 is thought to have great impact on several co-morbidities of the disease, all of which driven by inflammation. For instance, chronic inflammation is an important risk factor for the development of diabetic nephropathy in kidney, diabetic retinopathy of the eyes and diabetic liver inflammation resulting in NASH or even liver fibrosis. Interestingly, all of these complications are characterized by elevated levels of cytokines (interleukin-1, TNFalpha, IL-18 etc) and chemokines (MCP-1, MIF etc) suggesting that interference in inflammatory cytokine pathways disease is a feasible approach to come up with novel treatments.

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:

It is thought that chronic tissue inflammation determines the degree and speed by which DM2 and diabetic complications emerge. We and others have shown that high fat feeding in mice results in metabolic inflammation

('metaflammation') which is in turn associated with insulin resistance and DM2 (PLoS ONE, 2010). Little is known about possible underlying factors on the molecular level. Inflammatory cytokines such as IL-1, TNFalpha, IL-18 and MIF are thought to play a prominent role in the processes that result from high fat diet-feeding. A recently identified multi-protein complex called the 'inflammasome' (Nature, April, 2010) may be a sensor of metabolic overload. The inflammasome activates caspase-1 which can induce the formation of IL-1 and IL-18 from their inactive pro-forms. In this study, we wish to intervene in high fat-diet induced inflammation using specific anti-inflammatory compounds which allow to target the inflammasome.

Since it is unclear whether these anti-inflammatory treatments are more efficient in a prevention or in an intervention set-up, we first want to evaluate their efficacy under these two distinct experimental conditions in the present pilot study.

Based on the results obtained herein, a decision will be made for future studies (prevention or intervention set-up) and the most effective anti-inflammatory treatment will be used in a follow up-study. This follow-up study will then investigate the effects on endpoints of diabetic disease, for instance diabetic complications of the aorta or the kidney.

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 onderzoeksplan is opgesteld in nauw overleg tussen ervaren wetenschappelijke medewerkers van TNO- [redacted] en onderzoekers die betrokken zijn bij [redacted] ([redacted]). Het onderzoeksvoorstel werd door de interne beoordelingscommissie (IBC) van TNO beoordeeld. Het protocol komt in groten lijnen overeen met het eerder uitgevoerde studies (DEC 2867; 2925; 2908) waar we gebruik maken van dezelfde soort dieren (muizen met BL/6 achtergrond) en hetzelfde type HF lard dieet. In deze DEC's werden ook vergelijkbare dierexperimentele handelingen uitgevoerd (high fat diet feeding, tail blood sampling, extensive organ collection).

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, voor zover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

Mice:

C57BL/6 mice (60 mice in total) will be used for the experiment. Mice will be housed during the experiment in macrolon cages (2-4 mice per cage; ideally is 3 mice/cage (according to thesis dr.P.v.Loo)) in clean-conventional animal rooms (relative humidity 50-60%, temperature ~21°C, light cycle 6 am to 6 pm). Mice will be supplied with food and acidified tap water *ad lib*.

Dietary treatment and plasma sampling:

Prevention set-up (compound administration from 0 to 6 weeks):

Group P-1 will be fed maintenance chow and serve as a control (no metabolic inflammation). All other groups will be fed a high fat diet containing 24% w/w lard (groups P-2, P-3, P-4 and P-5) for 6 weeks. Group P-2 will develop maximal metabolic inflammation (untreated group), while group P-3, P-4 and P-5 will be treated with anti-inflammatory test compounds with specific mode of action (as specified below).

Blood samples will be collected in EDTA at t=0, 3 days (see remark below #) and in week 3, 6. About 100 µl EDTA blood will be taken per time point to determine inflammatory and metabolic parameters such as glucose, insulin, VCAM, SAA. Body weight and food intake will be monitored bi-weekly.

remark: On day 3, the plasma of the prevention groups will be taken to analyze the immediate effect of the compounds on high fat-induced metabolic inflammation.

Intervention setting (compound treatment from 6 to 12 weeks):

Group I-1 will be fed maintenance chow throughout the whole study period and serve as a control (no metabolic inflammation). All other groups will be fed a high fat diet containing 24% w/w lard (groups I-2, I-3, I-4 and I-5) from t=0 until week 12. Group I-2 will develop maximal metabolic inflammation (untreated group). The intervention with anti-inflammatory drugs will be started in week 6 and group I-3, I-4 and I-5 will be treated essentially as in the above prevention setting but between week 6 and 12.

Blood samples will be collected in EDTA in week 6, in week 9 and 12. About 100 µl EDTA blood will be taken per time point to determine inflammatory and metabolic parameters such as glucose, insulin, VCAM, SAA. Body weight and food intake will be monitored bi-weekly.

Sacrifice (prevention and intervention treatment):

At the end of treatment, the mice will be sacrificed using CO₂. Tissues to be collected include subcutaneous adipose tissue, visceral adipose tissue, epididymal adipose tissue, liver, muscle and kidney (see 'toelichting' below*).

Tissues will be stored at -80°C and/or immediately prepared for immunohistochemical analyses (staining) and analysis of the inflammatory state of the tissue / inflammasome activity.

* Toelichting weefselcollectie: De verschillende vetdepots worden verzameld omdat elk depot een eigen functie heeft en andere processen verantwoordelijk is (zie Caesar et al., PLoS, 2010). Het gewicht en de verdeling van de 'white adipose tissue' in de verschillende depots reflecteert hoe de dieren met het dieetvet omgaan en waar de vetstapeling plaats vindt. Het aantal macrofagen in het vet bepaalt bijvoorbeeld de kwaliteit van het vet (goed of slecht/inflamed vet). De gezondheidsstatus van de lever, spieren en nieren (vervetting & gewicht) wordt op vergelijkbare wijze geanalyseerd.

Experimental set-up

The mice will be divided into 1 control group and 4 experimental groups and fed the following diets:

	Prevention Group Sets	strain	
1	Chow	C57BL/6	Healthy control
2a	24% lard diet (i.p)	C57BL/6	Inflammasome / Tissue inflammation
2b	24% lard diet (gavage)	C57BL/6	Inflammasome / Tissue inflammation
3	24% lard diet + kinaret (IL1 signaling inhibitor)	C57BL/6	Prevention 1
4	24% lard diet + caspase-1 inhibitor	C57BL/6	Prevention 2
5	24% lard diet + thalidomide (TNF signalling inhibitor)	C57BL/6	Prevention 3
	Intervention Group Sets	strain	
1	Chow	C57BL/6	Healthy control

2a	24% lard diet (i.p.)	C57BL/6	Inflammasome / Tissue inflammation
2b	24% lard diet (gavage.)	C57BL/6	Inflammasome / Tissue inflammation
3	24% lard diet + kinaret (IL1 signaling inhibitor)	C57BL/6	Intervention 1
4	24% lard diet + caspase-1 inhibitor	C57BL/6	Intervention 2
5	24% lard diet + thalidomide (TNF signalling inhibitor)	C57BL/6	Intervention 3

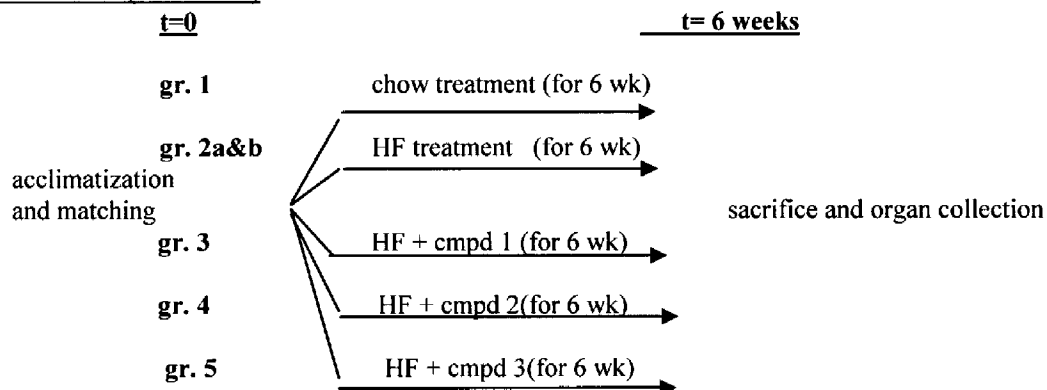
Diets:

- Chow (Ssniff® R/M-H) is the regular maintenance diet used at our facility and serves as control (main energy source is carbohydrate)
- Lard (Research Diets, D12451) is the regular high fat diet used in settings of obesity and diabetes. This diet is used by many research institutions worldwide and these diets do not have adverse effects; the diet has been tested in previous experiments (e.g. DEC 2867, 2908) and resulted in a diabetic state and elevated systemic plasma SAA levels (an indicator of chronic inflammation). A gavage (PBS) and an i.p. (PBS) control group will be included as proposed by the DEC.

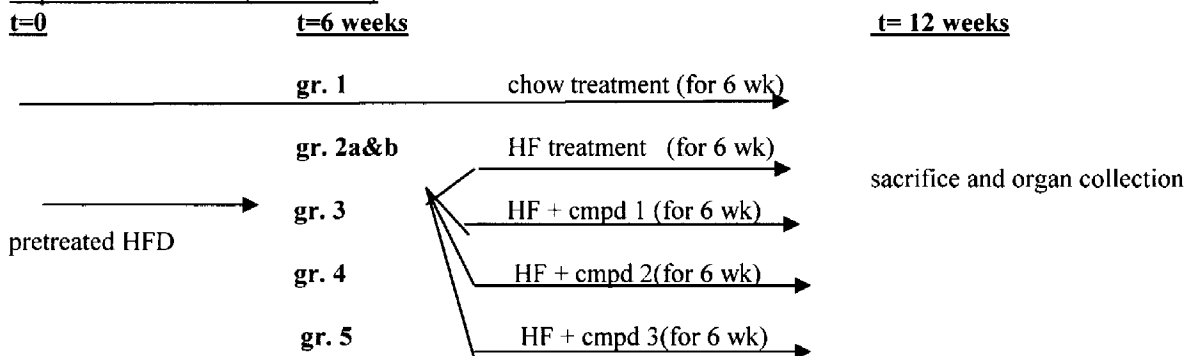
Interventions:

1. Kineret (IL1 receptor antagonist) is tolerated by BL/6 mice (previous experiments with this compound in 9023 DEC-LUMC and by colleagues at [REDACTED] (group of [REDACTED]) as well as in published studies (Sauter NS et al Endocrinology, 2008). In previous studies Kineret was administered daily by s.c. injection or ip injection and doses up to 100 mg /kg per day were tolerated by mice. In most published studies Kineret was applied at 10 mg/kg per day. In the present study we wish to administer Kineret at the same dose of **10 mg/kg body weight by i.p. injections (100 ul/injection) daily**. At this dosing regime long-term (12 wks) studies had been performed earlier in the context of high fat diet feeding; see Sauter NS et al. Endocrinology, 2008 without toxic events.
2. Treatment with the caspase-1 inhibitor Pralnacasan is tolerated well by mice (several studies with dosing up to 200 mg/kg body weight; daily; orally by gavage as published for instance in Cell Metab 2010; 12, 593-605 and in Bauer C, Dig Dis Sci, 2007). The same dose will be used in the present study: **200 mg/kg BW (100 ul gavage /daily)**.
3. The TNFalpha inhibitor thalidomide is tolerated by mice (several published studies). Herein, thalidomide will be administered as described by Pinto and Gambero et al, Liver Int. 2010. In this study thalidomide-treated mice received thalidomide i.p. (100 mg/kg BW/day). We wish to treat with a dose of **100 mg/kg BW (100 ul gavage daily)**.

Experimental scheme (Prevention)



Experimental scheme (Intervention)



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

Week	Action	technical procedures	Assays
t=0	Randomization of all mice into treatment groups and control group (on basis of bodyweight); starting plasma sample. Start feeding of high fat diet (Control groups remain on chow)	- Fasting tail EDTA blood (100 ul) all mice - body weight - food intake	Metabolic markers and inflammation markers in plasma
t= 3 days	Tail blood collection (100 ul) only in prevention arms	Fasting tail EDTA blood (100 ul)	Metabolic markers and inflammation markers in plasma
t= 3 week	Tail blood collection (100 ul) only in prevention arms	Fasting tail EDTA blood (100 ul)	Metabolic markers and inflammation markers in plasma
t= 6 weeks	Tail blood collection (100 ul) endpoint of prevention arms and start of intervention arms	Fasting tail EDTA blood (100 ul)	Metabolic markers and inflammation markers in plasma
t= 6 weeks + 3 days	Sacrifice of prevention groups	- Non-fasting heart puncture to collect total blood (use EDTA coated tubings) - Tissue collection (as described above)	Inflammasome measurements in tissues (Western blot)
t=9 weeks	Tail blood collection (100 ul) only intervention arms	Fasting tail EDTA blood (100 ul)	Metabolic markers and inflammation markers in plasma
t=12 weeks	Tail blood collection (100 ul) only intervention arms and sacrifice	Fasting tail EDTA blood (100 ul)	Metabolic markers and inflammation markers in plasma

T=12 weeks + 3 days	Sacrifice intervention groups	▪ Non-fasting heart puncture to collect total blood (use EDTA coated tubings) ▪ Tissue collection (as described above)	▪ Metabolic markers and inflammation markers in plasma
---------------------	-------------------------------	---	--

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.

Deze pilot studie is gericht op het inflammasome en beoogt middels anti-inflammatoire compounds 1) de activatie van het inflammasome (preventie set-up) tegen te gaan en 2) het inflammasome te deactiveren (als het al actief is). Recent hebben we een activiteitsassay opgezet om de inflammasome activiteit te meten (per Western blot). We konden bij een groepsgrote van n=5 dieren aantonen dat een high fat dieet een significant activerend effect heeft op het inflammasome. Voor deze pilot studie gericht op inflammasome activatie/deactivatie is daarom n=5 ook voldoende.

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 12 weken bij start; van Charles River om de resultaten van deze studie vergelijkbaar te houden met al uitgevoerde proef en de lopende experimenten). De keuze voor mannetjes is gebaseerd op het feit dat mannetjes beter op een hoog vet dieet reageren, dwz dat ze sterker in hun lichaamsgewicht toenemen op hoog vet dieet en dat ze diabetes ontwikkelen. Daarnaast zijn in voorgaand onderzoek omtrent insuline resistentie en type 2 diabetes ook mannetjes muizen gebruikt. Door nu weer mannetjes te gebruiken zijn de effecten in deze studie beter met andere studies in het verleden vergelijkbaar.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- x 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:

- X euthanasie ten behoeve van de proef
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

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

Groepshuisvesting in macrolon bakken (mits niet eerder door de dierfaciliteiten op n=1 gezet is onze voorkeur n=3 muizen/bak 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
Groep P-1 en I-1	10	Chow voer	>30 dagen	1
Groep P-2 t/m P-5 en I-2 t/m P-5	50	vet-verrijkt voer	>30 dagen	1
Alle groepen P-groups (t=0, 3 d, 3w, 6w) I-groups (t=0, 6w, 9w, 12w)	60	5 uur vasten	4 maal	1
Alle groepen P-groups (0, 2, 4, 6 w) I-groups (0,2,4,6,8,10,12 w)	60	Wegen	4 maal (P-groups) 7 maal (I-groups)	1
Alle groepen	60	Bloedafnames	4 maal	2
Alle groepen	60	Terminatie CO2	1 maal	1
Groep P-2a en P-3 en I-2a en I-2	20	i.p. injection test compd (every day)	>30 dagen	3
Groep P-2b, P-4, P-5 En I-2b, I-4, I-5	30	Gavage test compd (every day)	>30 dagen	3

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 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.]
- 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
------------------------	----------------------------	------------------------------

Groep P-1 en I-1	10	2
Groep P-2a,-2b, 3, 4, 5 I-2a,-2b, 3, 4, 5	50	3

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

nvt

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.

Complicaties worden niet verwacht omdat we al eerder vergelijkbare dierexperimenten (high fat feeding) hebben uitgevoerd zonder dat er bijzonderheden waren opgetreden (bijv. DEC2867 en 2630 en 2908).

Op basis van literatuurgegevens en persoonlijke communicatie is er geen aanwijsbare reden om extra complicaties te verwachten door de interventies die negatieve effecten op het welzijn van het dier kunnen hebben. De gavage en ip behandelingen om de dag brengen enig risico met zich mee, maar de mensen met artikel 9 en 12 goed getraind en hebben veel ervaring met het proefdierwerk. Daarom is de kans op complicaties als gevolg van het doseren gering.

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 zoals metabole inflammatie die door vetconsumptie wordt geïnduceerd 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:

De belangrijke uitleesparameter is de ontstekingsontwikkeling via het inflammasome in diverse organen (in het vet, in de lever, in de nier). Daarvoor is het gehele organisme nodig. Bij de reactie op een HF dieet zijn zeer veel verschillende weefsels en celtypen betrokken. Voor de studie van dergelijke complexe interacties zouden huidige *in vitro* alternatieven onvoldoende zijn. Er is gekozen voor een muis die op hoog vet dieet metabole stress ontwikkelt en als gevolg van de stress ontsteking ontwikkelt (C57BL/6 wildtype achtergrond).

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])

☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

☒ elders, n.l.: besproken met opdrachtgever

☐ 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:

HFD High Fat diet

DM2 Type 2 diabets mellitus



Onderzoeker



Expertisemanager

datum:

datum:

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