

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:

telefoon:

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Evaluatie van de ontwikkeling van diabetische nefropathie in hoogvet gevoerde APOE*3Leiden.CETP muizen

1.2. **studienummer:** -

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

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr:

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): biotechnisch analisten (art 12), en/of art. 9 medewerkers

Externe samenwerking (indien van toepassing): nvt

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: zsm

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

Geplande duur van het onderzoeksplan: 2 maanden

Locatie waar dieren worden gehouden:

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 tm 3	2	01	1	43	31	1	1	1	01	1	1	2	1

RELEVANTIE

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

Hoe snel ontwikkelt zich diabetische nefropathie in APOE*3Leiden.CETP muizen en hoe verhoudt dit zich ten opzichte van wild-type muizen?

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

Vermoedelijk als gevolg van veranderingen in leefgewoonten treedt er de laatste jaren een sterke toename op van de incidentie van overgewicht, metabool syndroom en type-2 diabetes. Hierbij nemen ook de complicaties, zoals diabetische nefropathie, diabetische retinopathie, verslechterde wondgenezing en hart en vaatziekten bij diabetes type 2 toe. Gepaard aan de toename van deze diabetische complicaties neemt ook de vraag naar medicijnen om de complicaties te bestrijden toe. Hiervoor zijn geschikte diermodellen nodig, die goed gekarakteriseerd zijn.

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:

Bij TNO hebben we recent steeds meer aandacht gegeven aan het ontstaan van diabetische complicaties. Een model voor spontane diabetische nefropathie (db/db muis) is gevalideerd in DEC 2822. Echter dit model is met name diabetisch zonder invloed van plasma lipiden. In het hyperlipidemische model APOE*3Leiden.CETP muizen hebben wij ook diabetische nefropathie gevonden (DEC2720), dit was echter na een lange interventie van 27 weken op hoogvet dieet met cholesterol en fructose drinkwater. Deze studie (DEC2720) was ontworpen om het model voor metabool syndroom te karakteriseren met name op plasma parameters, secundair hebben we toen gekeken naar de complicaties (lever en nier). Hieruit bleek dus dat een diabetische nefropathie was ontstaan. Graag zouden wij dit model voor diabetische nefropathie verder onderzoeken en bestuderen hoe snel de nefropathie ontstaat en hoe deze zich verhoudt tov wild-type dieren. Dit zal inzicht geven op het effect van risico factoren op het ontstaan van diabetische nefropathie. Het model zal dan ook beter gekarakteriseerd zijn en gevalideerd voor medicijn onderzoek.

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 en goedgekeurd in samenspraak tussen onze deskundigen.

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?

T=0 weken

35 mannelijke APOE*3Leiden CETP muizen en 8 leeftijds gematchte wild type littermates dieren worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden te bepalen op grond hiervan worden de APOE*3Leiden.CETP dieren gematcht in 2 groepen (groep 1, n=8 en 2, n=27)

1) gezonde controle groep	APOE*3Leiden.CETP	chow dieet	(n=8)
2A) Diabetische nefropathie groep	APOE*3Leiden.CETP	HFD + 1% chol +fructose	(n=9)
2B) Diabetische nefropathie groep	APOE*3Leiden.CETP	HFD + 1% chol +fructose	(n=9)
2C) Diabetische nefropathie groep	APOE*3Leiden.CETP	HFD + 1% chol +fructose	(n=9)
3) Wild type Hoog vet groep	Wild-type C57/Bl6	HFD + 1% chol + fructose	(n=8)

T=8 weken

Muizen worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen

T=14 weken

Muizen worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen. 9 dieren van groep 2 worden afgemaakt om diabetische nefropathie te bepalen (groep 2A)

T=20 weken

Muizen worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen. 9 dieren van groep 2 worden afgemaakt om diabetische nefropathie te bepalen (groep 2B)

T=26 weken

Muizen worden gewogen en er wordt na 4 uur vasten bloed afgenomen om plasma lipiden en glucose en insuline te bepalen. Alle dieren van groep 1, 2C en 3 worden afgemaakt om diabetische nefropathie te bepalen.

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

GROEP	BEHANDELING (diet)	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	geen	Lichaamsgewicht (5x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), euthanasie via CO ₂	8	♂
2A	HFD + 1.0% chol + 10% fructose water	Lichaamsgewicht (3x), 4 uur vasten (2x), bloedafname (2x), euthanasie via CO ₂	9	♂
2B	HFD + 1.0% chol + 10% fructose water	Lichaamsgewicht (4x), 4 uur vasten (3x), bloedafname (3x), euthanasie via CO ₂	9	♂
2C	HFD + 1.0% chol + 10% fructose water	Lichaamsgewicht (5x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), euthanasie via CO ₂	9	♂
3	HFD + 1.0% chol + 10% fructose water	Lichaamsgewicht (5x), 4 uur vasten (4x), bloedafname (4x), euthanasie via CO ₂	8	♂

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:

De groepsgrootte (6/groep) is gebaseerd op onze ervaring met de spreiding in de resultaten van voorgaande studie (DEC2720).

Uit experimenten uit het verleden is gebleken dat 15-20% van de APOE*3Leiden muizen laag responderen in cholesterol en triglyceride en ook 15-20% van de dieren (E3L.CETP en wild-type) minder obees en insuline resistent wordt op een hoog vet dieet (HFD). Dus additionele muizen worden aangevraagd.

Voor de gezonde chow groep zullen 2 additionele muizen worden aangevraagd (ivm low resp. laag triglyceriden)

Voor de groepen 2 zullen 3 additionele muizen worden aangevraagd (ivm low resp. obesitas/insuline resistentie en plasma lipiden) Voor de wild-type groep zullen 2 additionele muizen worden aangevraagd (ivm low-resp obesitas/insuline resistentie)

In totaal zullen 43 dieren aangevraagd worden.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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

mannelijke APOE*3Leiden muizen worden gebruikt voor deze studie uit een voorgaande studie is gebleken dat deze muizen diabetische nefropathie ontwikkelen na 26 weken op een HFD+1.0% cholesterol+ fructose water. Deze muizen zijn uitermate geschikt om hyperlipidemie op te wekken. Wild-type littermate (dus uit transgene fok) muizen worden gebruikt als controle voor een model met obesitas, insuline resistentie maar zonder hyperlipidemie.

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 ten behoeve van de proef (via CO₂)
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Groepshuisvesting 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
Groep 1, 2c en 3	25	Lichaamsgewicht	5x	1
Groep 1, 2c en 3	25	4h vasten	4x	1
Groep 1, 2c en 3	25	Bloedafname via staart	4x	2
Groep 2A	9	Lichaamsgewicht	3x	1
Groep 2A	9	4h vasten	2x	1
Groep 2A	9	Bloedafname via staart	2x	2
Groep 2B	9	Lichaamsgewicht	4x	1

Groep 2B	9	4h vasten	3x	1
Groep 2B	9	Bloedafname via staart	3x	2
Alle muizen	43	Euthanasia via CO2/strekken	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.]
- 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 1-3	43	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.
Bij afname staartbloed geen narcose omdat dit belastender geacht wordt dan bloedafname.

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

Bij meer dan 20% afvallen worden deze muizen uit de proef gehaald. Ook bij andere tekenen van ziekte (pilo erectie, afscheiding rond de ogen) worden dieren voortijdig geëuthanaseerd.

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

Uit het voorgaande experiment is gebleken, dat geen bijkomende risico's zijn te verwachten voor dit ziekte model.

ALTERNATIEVEN

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

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

Gezien de complexiteit van de metabole processen die leiden tot diabetische nefropathie kan dit slechts onderzocht worden in intacte diermodellen en bestaan er geen alternatieve methoden om diabetische nieren te ontwikkelen.

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

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.:

☒ X zo nee; waarom niet: Wij houden ons zelf continu 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?

De mannelijke E3L.CETP dieren staan al gereserveerd van de fok. Aangezien we de wild-type littermates leeftijds gematched willen hebben, kan het zijn dat we deze groep later inzetten, omdat deze vaak al direct na karakterisatie worden afgevoerd.

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

HFD: High fat diet

E3L.CETP: APOE*3Leiden.Cholesteryl Ester Transfer Protein

[REDACTED]
Onderzoeker/projectleider
datum:

[REDACTED]
Research Manager
datum:

Na behandeling:
secretaris DEC

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