

2011-8

Datum ontvangst DEC: 10 mei 2011
20 mei 2011 final

DEC nr: 3111

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:

[redacted]
[redacted]
[redacted]

telefoon: [redacted]

Kerngebied en locatie:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Validatie van Harlan E3L.CETP muizen als muismodel voor het metabool syndroom.

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): [redacted]

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

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

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

[redacted] en evt overige 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: [redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 5-6 maanden

Locatie waar dieren worden gehouden: [redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

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

RELEVANTIE

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

Validatie van Harlan E3L.CETP muizen als muismodel voor het metabool syndroom:

specifieke vragen:

Hoe is de ontwikkeling van het metabool syndroom in de Harlan muizen (vergelijkbaar met de muizen zoals op TNO gefokt)?

Wat is het effect van behandeling dmv rosiglitazone op het lichaamsgewicht en het glucose en lipid metabolisme in mannelijke ApoE3Leiden.CETP muizen van Harlan (respons vergelijkbaar met de muizen zoals op TNO gefokt)?

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, leidend tot metabole ontregeling (metabool syndroom, gekarakteriseerd door o.a. verhoogde plasma glucose en insuline niveau's, verhoogde triglyceriden, verlaagd HDL), insuline-resistentie en type-2 diabetes. Geneesmiddelen die insuline-gevoeligheid verhogen kunnen een bijdrage leveren aan het voorkomen of vertragen van de overgang insuline-resistentie → type-2 diabetes. Het is wenselijk om ook geneesmiddelen te ontwikkelen, aangezien het er voorlopig niet op lijkt dat veranderingen in leefgewoonten voldoende gestimuleerd kunnen worden om insuline-resistentie volledig te bestrijden.

Onze E3L.CETP muis (mannen op een hoog vet dieet met fructosedrinkwater) is een goed model voor het metabool syndroom omdat verschillende kenmerken van het metabool syndroom samen komen in dit model. Het model wordt regelmatig gebruikt om nieuwe medicijnen hiervoor te testen.

Onze E3L.CETP muis werd altijd door ons zelf gefokt, maar deze fok zal worden overgenomen door de proefdierleverancier Harlan. Hiervoor zijn eerst enkele muizen opgeschoond en vervolgens is met deze muizen een nieuwe schone fok gestart. Doordat de nieuwe fok is begonnen met een aantal schone muizen is er een bepaalde selectie geweest en bestaat de kans dat deze muizen anders reageren dan de oude muizen.

Inmiddels zijn de eerste muizen van Harlan beschikbaar. Deze muizen zullen worden getest in lipidstudies of de respons nog hetzelfde is (DEC3025).

In de huidige studie willen we bekijken of de respons van deze muizen ook hetzelfde is qua inductie en behandeling van het metabool syndroom. Naast de respons op lipiden, willen we zien of de inductie van obesitas, insuline resistentie en diabetische dyslipidemie nog vergelijkbaar is (in vergelijking met de historische data met de E3L.CETP muizen uit onze eigen fok).

Als behandelgroep wordt een groep muizen met rosiglitazone/pioglitazone behandeld. Rosi/pioglitazone is een geregistreerd medicijn dat wordt gebruikt bij type II diabetes om bloed glucose te verlagen en behoort tot de klasse van thiazolidinediones. Rosi/pioglitazone is al vaker gebruikt in onze E3L.CETP muis als model voor metabool syndroom en we hebben van deze compoundklasse dan ook de meeste historische data.

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:

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 de wetenschappelijke staf van 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?

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.

Run-in periode van 16-20 weken:

30 mannelijke APOE*3Leiden.CETP muizen worden op een hoog vet dieet gezet om obesitas en insulineresistentie te induceren. Na 8 weken zullen de muizen bovendien 10% fructose water

krijgen tot het einde van de proef (fructose induceert de VLDL produktie). Elke 4 wk zullen de muizen worden gewogen en zal na 4 uur vasten een bloedsample (70 μ L; geen narcose) via staartsnede worden afgenomen om plasmaparameters te bepalen.

T=0 weken:

Zes low responder muizen worden uitgesloten. De overige muizen worden dan gerandomiseerd op lichaamsgewicht, plasma glucose, insuline, cholesterol en triglyceriden en in 2 groepen van 12 muizen verdeeld:

- 1) control
- 2) rosi/pioglitazone 11 mg/kg/d

Behandeling met compound start dmv toevoeging aan het dieet.

T=2 en 4 weken

Muizen worden gevast, gewogen en bloed wordt afgenomen (80 μ L op t=2 en 120 μ L op t=4).

Direct na de bloedafname op t=4 weken worden de muizen geeuthenaseerd via CO₂ gevolgd door hartpunctie en orgaan collectie.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1	E3L.CETP Controle: HFD + fructosedrinkwater	Lichaamsgewicht (7-8x), 4 uur vasten + bloedafname (7- 8x), euthanasie via CO ₂ .	12	M
2	E3L.CETP treatment groep: HFD + fructosedrinkwater + rosi/pioglitazone	Lichaamsgewicht (7-8x), 4 uur vasten + bloedafname (7- 8x), euthanasie via CO ₂ .	12	M
Low. resp.	E3L.CETP: HFD + fructosedrinkwater	Lichaamsgewicht (5-6x), 4 uur vasten + bloedafname (5- 6x), euthanasie via CO ₂ .	6	M

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.

Op grond van eigen waarnemingen zijn er 25% low-responders wat betreft TC en/of TG bij de APOE*3Leiden.CETP muizen.

Rekening houdend met low responders wat betreft lipiden willen we in totaal 30 APOE*3Leiden.CETP muizen inzetten (hiervan zullen 6 muizen met lage TC en TG waarden geëxcludeerd worden na 16-20 weken inloop).

Powerberekeningen zijn gemaakt op grond van eigen waarnemingen: de groepsgrootte van de hoofdstudie (12/groep) is gebaseerd op onze ervaring met de spreiding in de plasma resultaten van de vorige proef. Hierbij is uitgegaan van een gemiddelde variatie van 30% en een gewenst minimaal verschil van 40%, bij een tweezijdige toets met 95% zekerheidsinterval. Dan kom je uit op ongeveer 12 muizen per groep.

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.

E3L.CETP muizen ♂♂, 10 weken oud op een hoog vet dieet en fructose drinkwater. Deze muizen worden dik en insulineresistent, maar vertonen ook diabetische dyslipidemie (itt wt muizen bv of ob/ob muizen).

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
- ☐ 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 (of individueel bij vechtende muizen) in macrolon bakken met kooiverrijking. Er is gebleken dat de E3L.CETP mannen van Harlan bijzonder veel vechten en daarom wellicht beter individueel gehuisvest kunnen worden. 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 & 2	24	Lichaamsgewicht	7-8x	1
1 & 2	24	Herhaalde bloedafnames vanaf staart (na 4h vasten)	7-8x	2
1 & 2	24	Euthanasie via CO2	1x	1
Low resp.	6	Lichaamsgewicht	5-6x	1
Low resp.	6	Herhaalde bloedafnames vanaf staart (na 4h vasten)	5-6x	2
Low resp.	6	Euthanasie via CO2	1x	1
1 & 2 + low resp	30	Kans op individueel huisvesten als muizen gaan vechten	Mogelijk gedurende de hele studie	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 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
------------------------	----------------------------	------------------------------

1 & 2	24	3
Low responders	6	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.

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

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.

Uit het voorgaande experiment is gebleken, dat bij de gebruikte doseringen van de rosi/pioglitazone geen bijkomende risico's zijn te verwachten.

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 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Gezien de complexiteit van het glucose en lipiden metabolisme kan het metabool syndroom slechts onderzocht worden 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])

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

☐ elders, n.l.:

☒ 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?

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:

CETP: humaan cholesterol ester tranfer protein

E3L: APOE*3Leiden

HDL: High density lipoprotein

LDL: Low densitiy lipoprotein

TC: total cholesterol

TG: triglycerides

VLDL: very low density lipoprotein

Onderzoeker 

Management

datum:

datum:

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