

2011-10

Datum ontvangst DEC: 20 mei 2011
8 juni 2011 final

DEC nr: 3117

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: [redacted]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Predictive biomarkers for obesity

1.2. **studienummer:**

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** EL&I cofinancierings project: Identification and validation of predictive biomarkers for obesity

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: zo spoedig mogelijk

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

Geplande duur van de onderzoeksplan: 8 weken

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	1	01	2	10	31	1	1	01	01	1	1	2	1
2	1	01	2	30	31	1	1	01	01	1	1	2	1

RELEVANTIE

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

1. Which biomarkers, based on lipidomics and cytokine analysis in early life, correlate with obesogenic diet-induced obesity in later life and are potentially predictive?
2. Can we find factors in plasma or urine that determine the susceptibility of an subject to become obese later in life and can we find a mechanistic rationale for this prediction?

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 + 6.a.2 Economisch belang

Obesity presents the world with an unprecedented public health challenge (World Health Organization, 2007). In adults, obesity is defined as having a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m² (BMI= weight (kg) / height (m²)), while overweight is defined as having a BMI of 25.0-29.9 kg/m². The obesity epidemic's rapid growth is linked to the global increase in the availability and accessibility of food combined with reduced physical activity. Food has never been so affordable and products high in fats and sugar are the cheapest. Thus, modern societies are seen as 'obesogenic' environments; meaning that they lead to overconsumption of food and to widespread sedentary lifestyles, which together increase the risks of obesity.

Both ethical and economic arguments call for accelerating action against obesity. In addition to harming the health and well-being of a vast proportion of the population and generating large expenditures by health services, obesity has a striking and unacceptable impact on children and adolescents. Obese subjects suffer longer years of exposure to the metabolic syndrome and show dramatically increased prevalence of diseases such as type-2 diabetes, cardiovascular diseases and cancer earlier in life.

Preventing obesity is thus an urgent public health goal that should be dealt with by and involve multiple stakeholders, spanning from government sectors to private sectors, including food manufacturers. To halt the rising trend of obesity and eventually reverse it, population-level health promotion and disease prevention measures are required, targeting high-risk individuals, together with effective treatment and care of obese individuals. Despite all efforts, the prevention and treatment of obesity has been unsuccessful. Therefore new approaches are needed.

In this project we will focus on determining biological markers (biomarkers) for predisposition to obesity. Currently there are no suitable biomarkers available that allow predicting whether a subject will become obese or not later in life. Appropriate biomarkers may be used as read-

outs for monitoring the effectiveness of (preventive) treatment regimens in human subjects, both by dietary and pharmacological means to prevent obesity.

6.a.3 Milieu belang

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

6.b Wetenschappelijk belang:

Metabolic Health research is an emerging field of research. A search in Pubmed for “obesity” results in almost 150'000 publications with more than 55'000 published within the last five years. Despite all the research, no good predictive biomarkers are published that can identify whether a subject is susceptible to develop obesity. Predictive biomarkers are not only useful for early identification of subjects at risk, but may also be used for optimizing study designs (subject selection) and reduce animal use. Eventually, the biomarkers may be used as read-outs for monitoring the effectiveness of (preventive) treatment regimens in human subjects, both by dietary and pharmacological means to prevent obesity. Ultimately, the biomarkers may be used to define a “susceptibility index” for obesity.

We will use an established humanized inbred mouse model of diet-induced obesity, the male ApoE3Leiden mouse. This ApoE3Leiden model is a unique model at TNO. In previous studies we have found that these mice show a large variability in the development of obesity on a standardized obesogenic diet. To further mimic the human situation and to influence the determinants of obesity in early life, feeding the obesogenic diet will be started in mice that are 12 weeks of age, which is comparable to the age of young adolescent humans (end of puberty). A prerequisite for a good biomarker is that its levels vary and correlate well with obesity outcome. It is also important that a biomarker can be measured easily in humans. Plasma or urine samples can be obtained from humans without difficulty. Therefore, biomarkers will be identified in plasma or urine samples in this study. Obesity is a result of excessive lipid storage into adipose tissue (and other tissues). Furthermore, fatty acids and metabolites can influence the selectivity and rate of lipid storage in adipose tissue. Consequently, a lipidomics approach (see Kleemann et al., PLoS ONE 2010; Bobeldijk et al, J Chrom B 2008) will be used for the identification of potential biomarkers, such as fatty acids and metabolites. Cytokine levels or ratios may also be good candidates for biomarkers, because inflammation plays an important role in the development of metabolic diseases (Gregor and Hotamisligil, Annu Rev Immunol. 2010). Therefore, inflammatory molecules (e.g. cytokine profiles) will be analyzed as well.

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?

Zo nee, waarom niet?

Het onderzoeksplan is opgezet door ervaren medewerkers van [REDACTED]
[REDACTED] Het onderzoeksvoorstel is beoordeeld door de beoordelingscommissie EL&I co-financiering en door de co-financier [REDACTED].

PROEFOPZET

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

- x nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/teststof)

- O herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DECnr.:
- O proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
wettelijke eis:
testrichtlijn:
- O proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- O 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.

Detailed experimental set-up:

Prior to the start of the experimental obesogenic diet feeding (at the age of 12 weeks), plasma and urine will be collected for an extensive profiling using lipidomics and inflammatory protein profiling. One group of mice (n=10) will be sacrificed prior to the start of the obesogenic diet to serve as control group reflecting the status quo before diet intervention. The other mice (n=30) will be fed the obesogenic diet. Body weight and food intake will be monitored weekly. At age 16 weeks (equals t=4 weeks after the start of the diet), a plasma (100 uL EDTA plasma collected after 5h fasting by tail incision without anesthesia) and urine sample (by fixation of the animal and collection of spontaneously urinated urine) will be taken for future analysis. After eight weeks of obesogenic diet feeding, plasma and urine will be collected and mice will be sacrificed with CO₂ (at age 20 weeks). Adipose tissue will be collected (subcutaneous, visceral, epididymal) to determine fat mass and fat distribution. Also, relevant tissues that might become fatty (liver, muscle, and kidney) will be weighed and stored for possible follow up mechanistic analysis such as lipid accumulation in these tissues. Body composition will be determined based on adipose tissue weight relative to total body weight. Adipose tissue quality will be analyzed by (immuno)histochemistry (analysis of representative depots).

The variation in the extent of obesity of these n=30 mice, which is typically seen between animals treated with an obesogenic diet, will be used to subsequently identify *early* biomarkers. To do so, a multi-variate correlation analysis will be performed (advanced in-house bioinformatics and biostatistics): the plasma lipids/metabolites measured using metabolomics/lipidomics (as well as inflammatory protein profiling) early in life (prior to the start of the obesogenic diet) will be correlated with obesity endpoints which are 1) the final body weight, 2) the overall adiposity, 3) adipose quality of a representative adipose depot (i.e. the size and inflammatory state of adipocytes) and 4) body composition (i.e. the distribution of fat over the various depots). Based on these correlations, early biomarkers (e.g. the ratio of specific fatty acids or a combination of inflammation markers) will be discovered that potentially predict the susceptibility of a subject to develop obesity in later life.

Obesogenic diet to be used:

- HFHS + LA/ALA: 24% (w/w) beef tallow, 20% (w/w) casein, 42% (w/w) dextrose, 4.4% (w/w) linoleic acid and 0.44% (w/w) alpha-linolenic acid

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
Groep 1: Reference t=0	Geen	1 x wegen 1 x spoturine 1 x Bloedafname (staartvene) na 5 uur vasten Opofferen (CO ₂)	10	male
Groep 2: Obesity groep	Obesogenic diet	4 x Wegen (bi-weekly) 3 x Bloedafname (staartvene) na 5 uur vasten (t=0, t=4 en t=8w) 3 x spoturine (t=0, t=4 en t=8w) Opofferen (CO ₂) op t=8w	30	male

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.

Voor het vinden van biomarkers voor de ontwikkeling van obesitas is spreiding in de dataset van belang. De op een vroeg tijdstip (bij start van studie op een leeftijd van 12 weken) gemeten markers moeten correleren met de obesitas-uitkomstwaarden aan het einde. Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat ApoE3L muizen op het beschreven obesogeen dieet goede spreiding in obesitas vertonen. De spreiding in de metabolische parameters in plasma en urine op jonge leeftijd is onbekend. We hebben het aantal muizen gebaseerd op eerdere studies in ApoE3L muizen waarin predictive metabolomics markers werden gevonden ([1]). Om betrouwbare correlaties te kunnen leggen en een mechanistische verklaringen te kunnen vinden is een groepsgrootte van n=30 nodig.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

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 APOE*3Leiden muizen (leeftijd 4 weken). De keuze voor mannetjes is gebaseerd op het feit dat mannetjes sterker in hun lichaamsgewicht toenemen op hoog vet dieet. Daardoor zijn effecten van de dieetsupplementen duidelijker zichtbaar te maken. Daarnaast zijn in het voorgaand onderzoek ook mannetjes muizen gebruikt. Door nu weer mannetjes te gebruiken zijn de effecten beter vergelijkbaar.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☐ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, **n.l.:**
- ☐ overcomplete dieren
- x 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, voedsysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Groepshuisvesting in macrolon bakken, max 4 muizen/bak, maar we streven erna om 3 per bak te huisvesten. 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	40	wegen	1 maal / 4 maal	1
1-2	40	Urine	1 maal / 3 maal	1
1	30	Bloedafname na 5 uur vasten	1 maal / 3 maal	2
1-2	40	Opofferen	1 maal	1

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 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
1-2	40	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. Het onderzoek gericht is op het endocriene systeem en bloedparameters. Deze kunnen sterk beïnvloed worden door pijnstilling tijdens de proef waardoor de uitkomsten niet betrouwbaar zijn, met name de lipiden en vrije vetzuren. Het ongerief tijdens het nemen van een bloedmonster van de staartvene is vergelijkbaar met het ongerief dat anesthesie teweeg brengt (injectie plus ontwaken uit anesthesie) Dit is ook de reden waarom is gekozen voor het opofferen 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.

Er worden geen specifieke risico's voorzien. Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat de muizen het obesogeen dieet prima tolereren, als mede de bloedafnames.

ALTERNATIEVEN

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 en het identificeren van de biomarkers die ten grondslag liggen aan obesitas bestaan op dit moment nog geen *in vitro* alternatieven. Het hele dier met alle organen is essentieel bij dit type onderzoek.

Het is gepland om de gevonden biomarkers in de mens te valideren (zijn ze aanwezig en in detecteerbare hoeveelheden) zodat snel de vertaalslag van muis naar mens gemaakt kan worden. Voor de mechanistische onderbouwing is echter weefsel nodig van depots die niet toegankelijk zijn bij de mens.

De biomarkers die bij dit onderzoek geïdentificeerd worden kunnen bij vervolg onderzoek worden gebruikt om groepen vooraf te karakteriseren op de vatbaarheid voor obesitas. Hierdoor kunnen homogenere groepen worden gekozen en daardoor zijn uiteindelijk minder proefdieren nodig.

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:

Voor onderzoek aan (de ontwikkeling) van obesitas is een heel organisme nodig die beschikt over alle organen zoals lever, spieren, diverse vetdepots, pancreas, hersenen etc.

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

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

O TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]

O Art. 14 functionaris [REDACTED]

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

x elders, n.l.: Door bezoek aan congressen en lezen van literatuur houden wij ons op de hoogte van alternatieve methoden.

O zo nee; waarom niet:

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:

ApoE3L: ApoE3Leiden muis

BMI: Body Mass Index

EL&I: ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie



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.