

2011-13

Datum ontvangst DEC: 8 juli 2011
21 juli 2011 final

DEC nr: 3138

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:** Interventions in inflammatory and metabolic homeostasis

1.2. **studienummer:**

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** Enabling Technologies Systems Biology (ETSB)

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 (ivm dicht gaan stallen)

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v.

DEC nr., via e-mail: [redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: 18 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: chow	1	01	2	12	33	1	1	01	01	1	1	3	1
2: HFD	1	01	2	12	33	1	1	01	01	1	1	3	1
3: HFD + insulin analogue	1	01	2	12	33	1	1	01	01	1	1	3	1
4: HFD + caspase inhibitor	1	01	2	12	33	1	1	01	01	1	1	3	1

RELEVANTIE

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

- How efficient can metabolically induced inflammation in adipose tissue be quenched with a systems approach? Is a systems-based strategy efficacious in terms of durability and intensity of the effect?
- Is the effect of systems intervention generic (i.e. for all adipose depots) or limited to specific depots?
- Does a systems intervention strategy affect both cellular inflammation and adipokines/cytokines?
- What is the effect of systems intervention into global adipose inflammation for overall metabolic health, including insulin resistance and DM2?

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 a complex multifactorial chronic metabolic disease that presents significant challenges to developing effective molecular diagnostics and successful therapies. We lack both a full understanding of its underlying mechanisms and the ability to personalize its diagnosis and treatment. The limitations of our current reductionistic approaches to prevent and treat DM2 become more and more evident: DM2 is diagnosed in more than 70,000 new patients each year in the Netherlands and the total number of patients (in the Netherlands) is estimated to be meanwhile more than 1,000,000.

Systems Biology seems uniquely suited to unravel the regulatory networks controlling the evolution of DM2 and its complications over time and to provide novel leads for more efficient therapeutic solutions.

By definition systems biology integrates all components of biological processes to describe and evaluate a complete biological system. There is increasing support for the concept that (chronic) inflammation is the driving force in the development of metabolic diseases such as DM2. However, knowledge on the nature and the location (e.g. liver, adipose tissue, intestine) of this inflammatory component is relatively scarce. The aim of this project is to intervene in global adipose inflammation to provide proof-of-concept and an example of systems intervention. To this end a novel concept will be pursued.

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:

A novel way to target and quench adipose tissue inflammation in a global way, i.e. without targeting specific pro-inflammatory molecular entities, is by using long-lasting, stable (non-metabolizable) compounds with an insulin-like structure.

To test the efficacy of this novel intervention strategy and its potency regarding the various adipose depots, groups of mice will be fed a high fat diet (lard) with or without test compound (for 18 weeks) to induce adipose tissue inflammation and insulin resistance of adipose tissue. A control group will be treated with placebo and treatment groups will be treated with the above described stable derivative of insulin or an inhibitor of caspase-1 to reduce chronic metabolic inflammation.

During the intervention period, it will be analyzed (clinical chemistry) whether or not insulin resistance is suppressed by the test compounds (measurement of glucose, insulin, HOMA, general inflammation markers, and insulin resistance-associated adipokines that reflect the health status of adipose tissue).

After sacrifice, the various adipose tissue depots and, for comparison, liver and muscle, will be isolated and investigated with respect to inflammatory status (inflammasome activity, cellular inflammation, crown like structures, immune cell infiltration, cytokine profile and NFkB, SOCS-3 and AP-1, three key mediators of inflammatory signals that impair insulin sensitivity).

This will provide insight into the generic character of the systems intervention (all depots or specific depots; all inflammatory routes or specific routes; cellular (macrophages) and/or molecular (adipokines) adipose inflammation).

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 opgesteld in nauw overleg tussen ervaren wetenschappelijke medewerkers van TNO [redacted] en onderzoekers die betrokken zijn bij het [redacted]. Het onderzoeksvoorstel werd door de interne beoordelingscommissie (IBC) van TNO beoordeeld

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.

Mice:

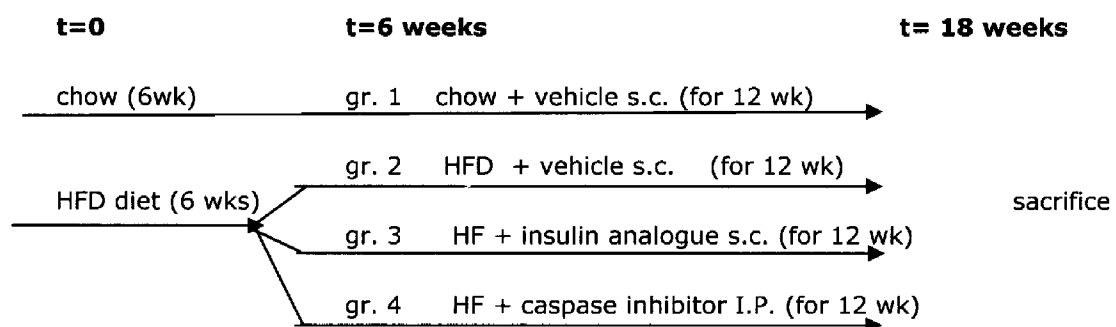
C57BL/6 male mice (48 mice in total) will be used for the experiment. Mice will be housed during the experiment in macrolon cages (2-4 mice per cage; ideally is 3 mice/cage (according to thesis dr.P.v.Loo)) in clean-conventional animal rooms (relative humidity 50-60%, temperature ~21°C, light cycle 6 am to 6 pm). Mice will be supplied with food and acidified tap water *ad lib*.

Diets:

- Chow (Ssniff® R/M-H) is the regular maintenance diet used at our facility and serves as control (main energy source is carbohydrate)
- High Fat Diet (HFD) (Research Diets, D12451) is the regular high fat (lard) 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). Furthermore it will develop adipose tissue inflammation.

Experimental scheme

The mice from groups 2-4 will be fed HFD for 6 weeks to induce early metabolic overload. After 6 weeks the intervention is started. Mice from group 3 will be injected daily (s.c.) with an insulin analogue and mice from group 4 will be injected with a caspase-1 inhibitor (IP). A positive control group will be fed HFD and a negative control group will be fed chow throughout the entire study period (18 weeks). The control groups will be injected with PBS. We decided to select subcutaneous injection as control injection.



Treatments:

Group 3 will be treated with daily s.c. injections (0.6 IU in 100 uL per day) of the long lasting insulin analogue Glargine. This dose is well tolerated as published by Chait et al (Diabetologia 2011) when administered daily for 12 weeks.

Group 4 will be treated with the caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CHO (10 mg/kg in 100 uL IP) as described in DEC 3075 and in literature (Sozen et al, 2009). This dose is well tolerated and effectively inhibits caspase-1.

Blood and urine samples:

At t=0, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks blood samples will be collected by tail incisions. About 100 µl EDTA blood will be taken per time point to determine inflammatory and metabolic parameters such as glucose, insulin, VCAM-1, SAA.

Urine samples will be taken at t=0, 6, 12 and 18 weeks by fixing the mouse and collection of spontaneously urinated urine.

Body weight and food intake will be monitored bi-weekly.

Tissue collection at sacrifice:

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.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
Groep 1: Chow – negatieve controle	Vehicle	9 x wegen 4 x spoturine 6 x Bloedafname (staartvene) na 4 uur vasten 12 weken dagelijkse s.c. injectie met PBS Opofferen (CO ₂)	12	male
Groep 2: HFD – positieve controle	Vehicle	High fat diet 9 x wegen 4 x spoturine 6 x Bloedafname (staartvene) na 4 uur vasten 12 weken dagelijkse s.c. injectie met PBS Opofferen (CO ₂)	12	male
Groep 3: HFD + insulin analogue	Insuline analoog	High fat diet 9 x wegen 4 x spoturine 6 x Bloedafname (staartvene) na 4 uur vasten 12 weken dagelijkse s.c. injectie met insuline analoog Opofferen (CO ₂)	12	male
Groep 4: HFD + caspase-	Caspase inhibitor	High fat diet 9 x wegen	12	male

1 inhibitor		4 x spoturine 6 x Bloedafname (staartvene) na 4 uur vasten 12 weken dagelijkse IP injectie met caspase-1 inhibitor Opofferen (CO ₂)		
-------------	--	--	--	--

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.

Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat een fasting plasma glucose en insuline, de belangrijkste uitlees parameters in plasma, de meeste spreiding laten zien na HFD. Om een significante verhoging van plasma glucose van 2.5 mM te laten zien met $p < 0.05$ (2-zijdig), power 0.8, is een groepsgrootte van $n=12$ minimaal nodig.

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 proeven 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

O aangekocht elders, n.l.:

O overcomplete dieren

O 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:

- ☒ 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 groepsamenstelling, kooitype, voedersysteem 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
2-4	36	High fat diet	18 weken	1
1-4	48	wegen	9 maal	1
1-4	48	urine	3 maal	1
1-4	48	Bloedafname na 4 uur vasten	6 maal	2
1-3	36	Dagelijkse s.c. injectie	Dagelijks gedurende 12 weken	3
4	12	Dagelijkse IP injectie	Dagelijks gedurende 12 weken	3
1-4	48	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
1-4	48	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.

Stress-/ pijnbestrijding voor de hier toegepaste biotechnische handelingen is niet wenselijk. Het onderzoek gericht is op het endocrine 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*

Dieren worden dagelijks beoordeeld op algehele conditie, activiteit, ademhaling en vacht. De dieren zullen uit de proef genomen worden indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief (niet meer eten/ ademhalings-problemen/ doffe smerige vacht etc.) optreden.

Dieren zullen worden geëuthanaseert indien een of meerdere van onderstaande criteria optreden tijdens het experiment:

- Aanzienlijke afname van het lichaamsgewicht vastgesteld door het zichtbaar worden van ribben of ruggengraat of afname van > 20% (2);
- Abnormaal gedrag, bijvoorbeeld:
 - # Benauwdheid/hijgen (1)

- # Salivatie (speekselvloed) (1)
- # Niet reageren op prikkels (2)
- # Aanhoudend (t)rillen (tremors) (2)
- # Aanhoudend stuiptrekken (convulsies) (2)
- # Zelfverminking (2)

- Pilo erectie (opzetten van de haren) (1)
- Abnormale houding (1)

Bij een score of combinatie van scores gelijk aan of groter dan 2 dient het dier te worden euthanaseert.

Deze bovengenoemde verschijnselen zijn in het kader van deze proef echter niet te verwachten

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 hoog vet dieet en de dagelijkse SC of IP injecties prima tolereren

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 netwerken die ten grondslag liggen aan DM2 bestaan op dit moment nog geen *in vitro* alternatieven. We zijn geïnteresseerd aan de weefsel-specifieke veranderingen tijdens het proces van DM2. Dit kan niet *in vitro* worden bestudeerd.

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 metabole ziekten zoals DM2 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:

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

☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED])

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

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

☐ 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:

ETSB: Enabling technology Systems Biology

HFD: High Fat Diet

DM2: Type 2 diabetes 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.