

2011 - 18  
afstemmingsuitzoek

Datum ontvangst DEC: 27 september 2011  
18 oktober 2011 final

DEC nr: 3176

## 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:** Vergelijking van het hoog vet diëet-geïnduceerde artrosemodel met het klassieke mechanisch geïnduceerde artrosemodel

**1.2. studienummer:** 051.01620

**1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** EL&I project 11.53.02.1689: OA: new mechanisms and models

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

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr:

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD):

Externe samenwerking (indien van toepassing):

[redacted] als  
Co-financier

##### 3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

oktober 2011

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

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

**Geplande duur van de onderzoeksplan:**

1 jaar

Locatie waar dieren worden gehouden: XXXXXXXXXX

#### 4. Codenummers volgens VWA-registratie:

| Groep                                                      | < kolommen > |    |   |     |    |   |   |    |    |    |    |    |    |
|------------------------------------------------------------|--------------|----|---|-----|----|---|---|----|----|----|----|----|----|
|                                                            | 1            | 2  | 3 | 4   | 5  | 6 | 7 | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 |
| <u>Hoog-vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel</u>       |              |    |   |     |    |   |   |    |    |    |    |    |    |
| pilot                                                      | 2            | 01 | 1 | 20  | 33 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1  | 1  | 3  | 1  |
| 1-13                                                       | 2            | 01 | 1 | 144 | 33 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1  | 1  | 3  | 1  |
| Low responders                                             | 2            | 01 | 1 | 51  | 33 | 1 | 1 | 01 | 01 | 1  | 1  | 2  | 1  |
| <u>Unilateraal ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat</u> |              |    |   |     |    |   |   |    |    |    |    |    |    |
| oefen                                                      | 1            | 02 | 1 | 6   | 33 | 1 | 1 | 1  | 01 | 4  | 4  | 3  | 1  |
| 1-9                                                        | 1            | 02 | 1 | 90  | 33 | 1 | 1 | 1  | 01 | 4  | 4  | 3  | 1  |

#### RELEVANTIE

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

Met de studie beschreven in deze aanvraag beogen we een aantal doelen:

1. Verdere ontwikkeling van het hoog vet dieet-geïnduceerde artrosemodel en interventie met anti-inflammatoire middelen (TNO vraag).
2. Effecten van anti-inflammatoire middelen in het hoog vet dieet-geïnduceerde artrosemodel *versus* een mechanisch geïnduceerd artros model (TNO vraag).
3. Effect van “polysulphated” cyclodextrine op de ontwikkeling van artrose in een hoog vet dieet-geïnduceerde artrose model en in een mechanisch-geïnduceerd artrosemodel (Arcarios vraag).

##### Ad 1. Verdere ontwikkeling van het hoog vet dieet-geïnduceerde artrosemodel

Tot op heden zijn er geen medicijnen die het proces van artrose kunnen stoppen of daadwerkelijk de patiënt kunnen genezen, ondanks het feit dat het maatschappelijke probleem heel groot is. Alhoewel in literatuur middelen beschreven staan die werkzaam zijn in de “klassieke” *in vivo* artrosemodellen (i.e. het proces wordt opgewekt door het gewricht te destabiliseren door transsectie van de kruisbanden (ACLT) of door meniscectomie of een combinatie ervan) heeft geen van deze middelen ooit de kliniek gehaald. De vraag rijst of dit soort modellen wel de juiste zijn, gegeven het feit dat er een continue trigger aanwezig blijft die het proces op gang houdt en daardoor eventuele remmende effecten van een compound op het proces van artrose kan teniet doen.

In een eerder onderzoek hebben we aangetoond dat muizen die een hoog vet dieet krijgen na verloop van tijd artrose in de kniegewrichten ontwikkelen. Dit gegeven is op zich niet nieuw, maar de artroseontwikkeling werd voornamelijk toegeschreven aan verhoogde mechanische belasting, terwijl wij in ons onderzoek juist hebben aangetoond dat ontsteking gerelateerd aan obesitas een belangrijke rol speelt in het artroseproces in dit model en niet zozeer de mechanische belasting. Gezien het feit dat obesitas een belangrijke risicofactor is voor artrose

lijkt de ontwikkeling van een hoog vet dieet-geïnduceerd artrosemodel voor de hand te liggen om te gebruiken in de ontwikkeling van medicijnen voor in ieder geval artrosepatiënten met metabool syndroom als onderliggende factor. Dit wordt ook onderschreven door onze collega's van [REDACTED], waar een studie gaat lopen om met imaging technieken het verloop van artrose te volgen in dit model.

Voor deze studie gaan we gebruik maken van ApoE3L.CETP muizen (mannetjes), omdat in een eerdere metabool syndroom studie (die overigens niet erop gericht was om het artrose aspect te bekijken) geconstateerd is dat deze muizen een ernstige vorm van artrose vertonen op een langdurig hoog vet dieet. Tegelijkertijd zullen we interventies uitvoeren met middelen die in de kliniek toegepast worden voor cardiovasculaire aandoeningen en diabetes, maar waarvan bekend is dat ze ook anti-inflammatoire eigenschappen bezitten. In de eerder genoemde ApoE3L.CETP studie zijn er al indicaties gevonden dat behandeling met fenofibraten (PPAR $\alpha$  agonist) een remmend effect kunnen hebben op de ontwikkeling van artrose. Statine en PPAR $\gamma$  agonist hebben in een eerdere studie met het hoog vet dieet-geïnduceerd artrosemodel (maar dan met de huCRP muis) al remmende effecten laten zien. Voor deze studie is bewust gekozen voor het ApoE3L.CETP model waarvan het lipidenprofiel meer lijkt op dat van de mens dan een gewone muis, waardoor mogelijk de resultaten beter te vertalen zijn naar de kliniek.

#### Ad 2. Hoog vet dieet-geïnduceerd artrosemodel versus een mechanisch-geïnduceerd artrose model

Zoals hierboven aangegeven wordt tot op heden vooral de mechanisch-geïnduceerde *in vivo* artrosemodellen gebruikt in de ontwikkeling van geneesmiddelen met echter minimaal resultaat. Om de industrie te overtuigen van de voordelen van het hoog vet dieet-geïnduceerde *in vivo* artrosemodel is het goed om deze twee type modellen tegen elkaar af te zetten en met name hoe ze reageren op interventies. Er is zeer beperkte literatuur aanwezig over de effecten van de anti-inflammatoire middelen die gebruikt worden in deze studie in de mechanisch-geïnduceerde modellen, maar deze literatuur laat wel remmende effecten zien waarschijnlijk door lokale (dus in het gewricht) inflammatoire processen te remmen. Echter concentraties en toedieningsroutes wijken af van datgene wat wij gebruikt hebben in het hoog vet dieet-geïnduceerde model waardoor het niet mogelijk is om de effectiviteit van deze middelen in de modellen tegen elkaar af te zetten.

Voor het vergelijk willen we het ACLT/Mnx model in ratten gebruiken. Dit lijkt op het eerste gezicht vreemd om twee species met elkaar te vergelijken, maar in de industrie wordt dit ratten artrosemodel meer gebruikt dan het destabilisatiemodel (artrosemodel) in muizen. Daarnaast past het niet in de strategie van TNO om de mechanisch-geïnduceerde modellen verder te ontwikkelen. In het verleden hebben we het rat ACLT/Mnx model in beperkte mate opgezet, maar wel met voldoende inzicht in de duur die nodig is voor de ontwikkeling van artrose. Voor het destabilisatiemodel in muizen hebben we deze ervaring in het geheel niet en zouden we eerst een pilot moeten draaien om de ontwikkeling van artrose te volgen.

Wij zijn van mening dat dit vergelijk de industrie kan overtuigen van de voordelen van het hoog vet dieet-geïnduceerde model in muizen ten opzichte van de mechanisch-geïnduceerde “klassieke” modellen.

#### Ad 3. Effect van “polysulphated” cyclodextrine op de ontwikkeling van artrose in een hoog vet dieet-geïnduceerd artrose model en in een mechanisch-geïnduceerd artrosemodel

De co-financier van dit project wil hun compound “polysulphated” cyclodextrine verder ontwikkelen voor toepassing in artrosepatiënten. Hiertoe wil het bedrijf in beide modellen een dosis range testen om inzicht te krijgen in effectiviteit en concentraties die nodig zijn om het artroseproces te onderdrukken. In het mechanisch-geïnduceerde model zal de compound intra-articulair (i.a.) toegediend worden wat ook de route zal worden in de kliniek. Uit *in vitro* experimenten blijkt dat de compound een gunstig effect heeft op de synthese van kraakbeen en met de lokale toediening in het rat ACLT/Mnx model wordt verwacht dat de compound het artroseproces remt door de synthese van kraakbeen te bevorderen. In het hoog vet dieet-geïnduceerde muismodel zal de compound subcutaan worden toegediend, omdat i.a. toediening in het kniegewricht van de muis heel lastig is. Hetzelfde werkingsmechanisme wordt beoogd, namelijk kraakbeenherstel door bevordering van de synthese. Daarnaast zijn er aanwijzingen vanuit *in vitro* experimenten dat deze compound ook anti-inflammatoire eigenschappen bezit. Daarom zou deze compound een additioneel effect hebben door ontsteking te remmen lokaal in het rat ACLT/Mnx model of systemisch in het hoog vet dieet-geïnduceerde artrose muizenmodel.

## **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**

Artrose (het engelse osteoarthritis of OA) of kraakbeenslijtage is één van de meest voorkomende ouderdomsaandoeningen. Tien procent van de 60-plussers heeft chronische pijn en gewrichtsdeformaties vanwege OA en is daardoor ernstig gehinderd in het dagelijks functioneren. Mede door de vergrijzing en de toename van metabool syndroom zal het aantal patiënten de komende jaren sterk groeien. Helaas is er momenteel geen geneesmiddel beschikbaar tegen OA en patiënten worden voornamelijk behandeld met pijnstillers. OA staat hierdoor in de top-5 van kosten voor de gezondheidszorg in Europa. Zowel vanuit patiënten als vanuit economisch perspectief is er dus een grote behoefte aan nieuwe geneesmiddelen. In dit kader wordt artrose in het WHO rapport over ‘Priority Medicine’ ook specifiek benoemd als ziekte waarvoor het ontwikkelen van biomarkers en therapieën essentieel is. De ziekte wordt gekenmerkt door een heterogene ontwikkeling, waardoor de uitkomsten van klinische trials tot op heden moeilijk interpreteerbaar zijn geweest. Met deze aanvraag willen we het hoog vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel promoten als model voor de ontwikkeling van geneesmiddelen voor vooral patiënten met metabool syndroom als onderliggende factor. Op deze manier dragen we ook bij aan een stuk stratificatie van patiënten waar het OA veld eigenlijk op zit te wachten, omdat dit de enige manier zal zijn om klinische trials goed op te zetten in de toekomst. Tegelijkertijd met dit experiment zal ook *in vitro* gezocht worden naar pathways die belangrijk zijn voor de ontwikkeling van metabool-syndroom geassocieerde OA. Wij hopen op deze manier ook biomarkers te vinden die gevalideerd kunnen worden in de *in vivo* modellen die uitgevoerd worden binnen deze aanvraag.

#### **6.a.2 Economisch belang**

Het chronische karakter van OA en de toenemende mate van invaliditeit die daarmee gepaard gaat brengen relatief hoge kosten met zich mee, die uiteenvallen in de directe medische kosten en daarnaast de indirecte kosten als gevolg van (gedeeltelijke) arbeidsongeschiktheid. De ‘Bone and Joint Decade’ (een WHO initiatief om de kwaliteit van leven van mensen met aandoeningen aan het

bewegingsapparaat tw verbeteren) geeft aan dat: ‘...The economic consequences of osteoarthritis are enormous, for example, it is rated the highest cause of work loss in USA, despite being a condition that causes most problems to populations after retirement age...’

### **6.a.3 Milieu belang**

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

Het chronische progressieve karakter van OA is in toenemende mate belastend (zowel fysiek als psychisch) voor zowel patiënt als directe omgeving (familie/verzorgers).

### **6.b Wetenschappelijk belang:**

In de laatste tien jaar heeft TNO, [REDACTED] grote expertise opgebouwd op een aantal ziektegebieden, waaronder ontstekingsziekten, gewrichtsaandoeningen (artrose en reuma), fibrose, hart- en vaatziekten (atherosclerosis) en neurologische aandoeningen. Deze kennis is mede gestoeld op een groot aantal *in vitro* en *in vivo* ziektemodellen, die momenteel worden toegepast om ziektemechanismen op te helderen, om nieuwe geneesmiddelen te testen in samenwerking met farmaceutische en biotechnologie bedrijven, en om eigen ziekte targets te ontwikkelen en patenteren. De laatste jaren heeft het onderzoek op het gebied van artrose zich voornamelijk gericht op de relatie obesitas en artrose (onderzoek van [REDACTED] in het kader van een [REDACTED] project). Dit project is een voortzetting van dit onderzoek, waarbij we proberen steeds meer inzicht te krijgen in de processen die een rol spelen bij metabool syndroom geassocieerde artrose. Dit geeft op langere termijn tools in handen om patiëntenpopulaties te identificeren die belang kunnen hebben bij een bepaalde therapie (dus steeds meer richting personalized medicine). Het hoog vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel is dan een model om geneesmiddelen te ontwikkelen voor artrosepatiënten met onderliggend metabool syndroom als ziekteproces. Echter het is niet ondenkbaar dat het model toepasbaar is voor een bredere patiëntenpopulatie als blijkt dat bepaalde onderliggende artroseprocessen (namelijk inflammatoire pathways) overeenkomstig zijn tussen obese en niet-obese patiënten.

### **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 voorstel is beoordeeld en toegekend door de EL&I commissie. Vervolgens hebben TNO en [REDACTED] gezamenlijk het protocol in detail opgesteld.

**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:

- 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.

##### Hoog vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel

Deze studie heeft een looptijd van 32 weken en wordt na exclusie van low-responders uitgevoerd met 144 mannelijke volwassen APOE3Leiden.CETP transgene muizen. De muizen uit de controle groep (groep 1) zullen standaard chow dieet krijgen (n=12). De andere muizen (n=132) zullen op een hoog vet dieet gezet worden (35% LARD + fructosewater).

Op t=0 en 12 weken wordt 200 µl bloed afgenomen via staartincisie (na 4 uur vasten) om plasmaparameters te bepalen (glucose, insuline, cholesterol en triglyceriden). Op t=0 worden de muizen gerandomiseerd op lichaamsgewicht, plasma glucose, insuline, cholesterol en triglyceriden en verdeeld in 2 groepen, namelijk groep 1 (chow) en groep 2-13 (hoog vet).

Op t=12 weken worden de low-responders uitgesloten van het experiment, dit zullen naar verwachting 44 muizen zijn (25%). De overige muizen op hoog vet dieet worden gerandomiseerd op lichaamsgewicht, plasma glucose, insuline, cholesterol en triglyceriden en verdeeld in 12 groepen.

Om het verloop van artrose te kunnen bestuderen en te weten wanneer een therapeutische interventie gestart moet worden, willen we een pilot groep (n=20 + 7 (low-responder)) 4 weken eerder starten en opofferen op t=12, 16, 20 and 24 weeks (n=5 per tijdstip). Deze muizen worden op t=0 gerandomiseerd op lichaamsgewicht, plasma glucose, insuline, cholesterol en triglyceriden en verdeeld in 4 groepen.

De groepen zijn als volgt:

- Pilot, hoog vet dieet n=20, leeftijd 10-16 weken
- 1) Chow n=12, leeftijd 10-16 weken
- 2) Hoog vet dieet n=12, leeftijd 10-16 weken
- 3) Hoog vet dieet plus atorvastatine profylactisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 4) Hoog vet dieet plus atorvastatine therapeutisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 5) Hoog vet dieet plus fenofibraat profylactisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 6) Hoog vet dieet plus fenofibraat therapeutisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken

- 7) Hoog vet dieet plus niacine profylactisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 8) Hoog vet dieet plus niacine therapeutisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 9) Hoog vet dieet plus atorvastatin en fenofibraat profylactisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 10) Hoog vet dieet plus atorvastatin en fenofibraat therapeutisch  
n=12, leeftijd 10-16 weken
- 11) Hoog vet dieet polysulphated cyclodextrin, low dose  
n=8, leeftijd 10-16 weken
- 12) Hoog vet dieet polysulphated cyclodextrin, mid dose  
n=8, leeftijd 10-16 weken
- 13) Hoog vet dieet polysulphated cyclodextrin, high dose  
n=8, leeftijd 10-16 weken

Atorvastatine, fenofibraat en niacine worden door het voer (35% LARD) gemengd. Definitieve doses van de diverse middelen zullen nader bepaald worden in overleg met de onderzoekers die deze middelen vaker in dit metabool syndroom model toepassen.

Polysulphated cyclodextrine zal s.c. 2x per week gegeven worden. Het injectievolume van de s.c. behandeling is 100 µl per keer.

Profylactische behandelingen starten op week 12 tenzij uit de pilot groep aanwijzingen zijn dat de artrose ontwikkeling al eerder begint.

Therapeutische behandelingen starten op een nader te bepalen week, deze informatie moet komen uit de pilot groep die 4 weken eerder gestart wordt.

Op t=0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 en 32 weken worden de muizen gewogen.

Op t=16, 20, 24, 28 en 32 weken wordt weer (200 µl) bloed afgenomen na 4 uur vasten om plasmawaarden van glucose, insuline, cholesterol en triglyceriden te bepalen, maar ook om potentiële biomarkers voor artrose te kunnen meten (dit moet volgen uit het *in vitro* werk binnen het EL&I project).

Op t=0, 12, 16, 20, 24, 28 en 32 weken zal tevens 'spot' urine worden verzameld. Dit zal gebeuren door de dieren op te tillen en de urine te verzamelen. In deze urine samples zullen kraakbeen/bot afbraak markers bepaald worden.

Aan het einde van de studie (t=32) worden de muizen geëuthaniseerd met behulp van CO<sub>2</sub> en wordt een hartpunctie gedaan om serum te verzamelen. Beide achterpootjes worden gebruikt voor histologische analyses (standaard + immunohistochemie) en tevens zullen we kijken naar de ontwikkeling van artrose in andere gewrichten (voorpoten, wervelkolom). De hoeveelheid artrose ontwikkeling zal worden bepaald. Overige organen en weefsel worden eventueel ook verzameld.

#### Mechanisch-geïnduceerd artrose ratmodel

##### Operatieprocedure

- De operatie wordt aseptisch uitgevoerd onder isofluraan anesthesie.
- De ratten worden tijdens de operatie op 37°C gehouden m.b.v. een warmteplaat.
- Knieën worden geschoren en gedesinfecteerd.

- Aan de mediale zijde wordt een incisie in de huid gemaakt in de lengterichting.
- Een hemostat wordt gebruikt om kleine bloedingen zo snel mogelijk te stelpen.
- Aan de mediale zijde van de knieschijfpees wordt een incisie gemaakt om vervolgens de patella naar de laterale zijde weg te klappen.
- Eerst wordt de mediale meniscus verwijderd en vervolgens wordt de voorste kruisband doorgesneden.
- Het gewricht wordt gespoeld met een steriele en lichaamswarme fysiologische zoutoplossing.
- Na terugplaatsing van de patella wordt de wond gehecht (4-0 Safil violet oplosbaar, snijdend ds 19).
- Pijnstilling wordt pre-operatief alsmede 3 dagen na de operatie gegeven als pijnstilling (te bespreken met de proefdierdeskundige, nu gebaseerd op Temgesic: 3x per dag 0.04 mg/kg s.c.).
- Na de operatie krijgen de ratten 2-3 ml warme glucose-oplossing s.c. en worden op 37°C gehouden m.b.v. een warmtemat.

#### Oefenen van de microchirurgische ingreep

Aangezien het al een tijd geleden is dat [REDACTED] en [REDACTED] deze microchirurgische techniek (ACLT in combinatie met meniscectomie) hebben uitgevoerd, zullen zij ieder eerst oefenen op 3 ratten (bilateraal) die na 10 dagen geëvalueerd zullen worden. Hierbij wordt de variatie van de operatie (binnen 1 persoon) alsmede de variatie tussen de chirurgen bekeken. Dit zal worden bepaald aan de hand van de macroscopische evaluatie van de kruisband transsectie en de verwijdering van de mediale meniscus. Daarnaast wordt ook de beschadiging van gewrichtskraakbeen door operatie-instrumentarium (scalpel, schaartjes, etc.) geëvalueerd.

#### Hoofdstudie: unilateraal ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat

Deze studie heeft een looptijd van 14 weken (12 weken behandelen) en wordt uitgevoerd met 90 mannelijke Lewis ratten 15 weken oud.

De operatie wordt unilateraal uitgevoerd, waardoor het niet geopereerde gewricht kan worden gebruikt als interne controle.

De groepen zijn als volgt:

- |             |                                                                           |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1) ACLT/Mnx | n=10, leeftijd 15 weken (controle voor groep 2-4)                         |
| 2) ACLT/Mnx | standaard voer plus atorvastatine<br>n=10, leeftijd 15 weken              |
| 3) ACLT/Mnx | standaard voer plus fenofibraat<br>n=10, leeftijd 15 weken                |
| 4) ACLT/Mnx | standaard voer plus niacine<br>n=10, leeftijd 15 weken                    |
| 5) ACLT/Mnx | vehicle i.a. (controle voor groep 6-9)<br>n=10, leeftijd 15 weken         |
| 6) ACLT/Mnx | polysulphated cyclodextrin, low dose (1 mg/ml)<br>n=10, leeftijd 15 weken |
| 7) ACLT/Mnx | polysulphated cyclodextrin, mid dose (3 mg/ml)<br>n=10, leeftijd 15 weken |

- 8) ACLT/Mnx polysulphated cyclodextrin, high dose (10 mg/ml)  
n=10, leeftijd 15 weken
- 9) ACLT/Mnx hyaluronic acid (referentie compound)  
n=10, leeftijd 15 weken

Atorvastatine, fenofibraat en niacine worden door het standaard voer gemengd.  
Vehicle, Polysulphated cyclodextrine en hyaluronic acid zullen wekelijks intra-articulair (i.a.) gegeven worden onder isofluraan anesthesie.

De behandelingen die door het voer gaan worden op dag 0 gestart. De intra-articulaire behandelingen zullen 2 weken na de operatie van start gaan. Het injectievolume van de intra-articulaire behandelingen is 50 µl per keer.

Op t=0, 2, 4, 8, 12 en 14 weken worden de ratten gewogen.

Op t=0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 en 14 weken wordt via staartincisie ( $\pm 750$  µl) bloed afgenomen om potentiële biomarkers voor artrose te kunnen meten (dit moet volgen uit het *in vitro* werk binnen het EL&I project).

Op t=0, 2, 4, 8 en 12 weken zal tevens urine worden verzameld door de ratten overnacht op metabole kooien te plaatsen. In deze urine samples zullen kraakbeen/bot afbraak markers bepaald worden.

Aan het einde van de studie (t=14) worden de ratten geëuthaniseerd met behulp van CO<sub>2</sub> en wordt een hartpunctie gedaan om serum te verzamelen. Beide achterpoten worden gebruikt voor histologische analyses (standaard + immunohistochemie) om de artroseontwikkeling te evalueren. Tevens zal synoviaal vocht verzameld worden op eindpunt om biomarkers op lokaal niveau te kunnen meten. Andere organen en weefsels zullen ook verzameld worden.

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

## Hoog-vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel

| GROEP | BEHANDELING                                        | BIOTECHNISCHE<br>HANDELING(EN)                                                                                                      | AANTAL | SEXE |
|-------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------|
| Pilot | Hoog vet dieet                                     | Wegen (4-7x)<br>4 uur vasten (2-5x)<br>Bloedafname via staartincisie (2-5x)<br>Urine (2-5x)<br>Euthanasie na 12, 16, 20 en 24 weken | 20     | M    |
| 1     | chow                                               | Wegen (9x)<br>4 uur vasten (7x)<br>Bloedafname via staartincisie (7x)<br>Urine (7x)<br>Euthanasie na 32 weken                       | 12     | M    |
| 2     | Hoog vet dieet                                     | Zie groep 1                                                                                                                         | 12     | M    |
| 3     | Hoog vet dieet plus<br>atorvastatine profylactisch | Zie groep 1                                                                                                                         | 12     | M    |

|                |                                                              |                                                                                      |                |   |
|----------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|
| 4              | Hoog vet dieet plus atorvastatine therapeutisch              | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 5              | Hoog vet dieet plus fenofibraat profylactisch                | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 6              | Hoog vet dieet plus fenofibraat therapeutisch                | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 7              | Hoog vet dieet plus niacine profylactisch                    | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 8              | Hoog vet dieet plus niacine therapeutisch                    | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 9              | Hoog vet dieet plus atorvastatin + fenofibraat profylactisch | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 10             | Hoog vet dieet plus atorvastatin + fenofibraat therapeutisch | Zie groep 1                                                                          | 12             | M |
| 11             | Hoog vet dieet Polysulphated cyclodextrine, low dose         | Zie groep 1<br>Subcutane injectie 2x per week, totaal 40x                            | 8              | M |
| 12             | Hoog vet dieet Polysulphated cyclodextrine, mid dose         | Zie groep 1<br>Subcutane injectie 2x per week, totaal 40x                            | 8              | M |
| 13             | Hoog vet dieet Polysulphated cyclodextrine, high dose        | Zie groep 1<br>Subcutane injectie 2x per week, totaal 40x                            | 8              | M |
| Low responders | Hoog vet dieet                                               | Wegen (4x)<br>4 uur vasten (2x)<br>Bloedafname via staartinicisie (2x)<br>Euthanasie | 44 + 7 (pilot) | M |

Unilateraal ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat

| GROEP      | BEHANDELING                                                                                 | BIOTECHNISCHE<br>HANDELING(EN)                                                                                                                                                                      | AANTAL | SEXE |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------|
| Oefengroep | t=0: ACLT + meniscectomie + operatie<br>t=10 dagen: euthanasie                              | Isofluraan anesthesie<br>Bilaterale ACLT + meniscectomie<br>operatie<br>Pijnstilling (s.c.; 12x)<br>Bolus glucose (s.c.; 1x)<br>Euthanasie                                                          | 6      | M    |
| 1          | t=0: ACLT + meniscectomie + operatie<br>t=14 weken: euthanasie                              | Isofluraan anesthesie<br>Unilaterale ACLT + meniscectomie<br>operatie<br>Pijnstilling (s.c.; 12x)<br>Bolus glucose (s.c.; 1x)<br>Wegen (6x)<br>Bloedafname (8x)<br>Metabole kooi (5x)<br>Euthanasie | 10     | M    |
| 2          | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>atorvastatin (via voer) | Zie groep 1.                                                                                                                                                                                        | 10     | M    |
| 3          | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>fenofibraat (via voer)  | Zie groep 1.                                                                                                                                                                                        | 10     | M    |
| 4          | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>niacine (via voer)      | Zie groep 1.                                                                                                                                                                                        | 10     | M    |

|   |                                                                                                            |                                                                                       |    |   |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|---|
| 5 | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>vehicle                                | Zie groep 1<br>i.a. injectie onder isofluraan anesthesie<br>(1x per week, totaal 12x) | 10 | M |
| 6 | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>polysulphated cyclodextrine, low dose  | Zie groep 5                                                                           | 10 | M |
| 7 | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>polysulphated cyclodextrine, mid dose  | Zie groep 5                                                                           | 10 | M |
| 8 | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>polysulphated cyclodextrine, high dose | Zie groep 5                                                                           | 10 | M |
| 9 | t=0: ACLT + meniscectomie operatie<br>t=14 weken: euthanasie<br><br>hyaluronic acid                        | Zie groep 5                                                                           | 10 | 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.

Hoog vet dieet-geïnduceerd artrose muismodel

Pilotstudie: 20 muizen + 7 low responders

Hoofdstudie: 144 muizen + 44 low-responders

Het doel van de pilotstudie is om uit te zoeken wanneer de therapeutische behandeling kan starten. We zijn dus niet op zoek naar statistisch significante verschillen en denken dat n=5 per tijdstip (t=12, 16, 20 en 24 weken) voldoende is om dit vast te stellen.

Voor de hoofdstudie is gekozen voor n=12 per groep op grond van beperkte gegevens uit een eerdere studie met ApoE3L.CETP muizen op hoog vet dieet. In deze studie zagen we bijna gehele onderdrukking van het artroseproces met fenofibraatbehandeling (met 8 muizen per groep was de p-waarde 0.04). Uitgaande dat we ook gedeeltelijke onderdrukking van het artroseproces willen kunnen detecteren is er gekozen voor n=12 per groep voor de groepen 1-10. Groepen 11-13 zullen met n=8 worden uitgevoerd worden, aangezien de co-financier wel geïnteresseerd is in wat het effect van polysulphated cyclodextrine in het hoog vet dieet is, maar niet direct significante effecten nodig heeft.

ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat

Oefengroep: 6 ratten

Hoofdstudie: 90 ratten

Het aantal ratten per groep is gebaseerd op literatuurgegevens en een eerdere ervaring met dit model. Wij hebben dit model 1x gedraaid met een tijdreeks om de ontwikkeling van artrose te bestuderen en konden macroscopisch verschillen ten opzichte van de controle groep (geen artrose) zien met een groepsgrootte van n=8. Echter we hebben geen eigen gegevens van effecten van compounds in dit model. Aangezien we niet verwachten dat we totale onderdrukking van artrose (dus naar controle niveau) krijgen door een behandeling, hebben we gekozen voor n=10.

**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.

Hoog vet dieet-geïnduceerd artrose muismodel

ApoE3L.CETP muizen, mannetjes, 10-16 weken oud.

Deze muizen worden op een hoog vet dieet dik en insulineresistent en vertonen ook diabetische dyslipidemie. Daarnaast hebben we recent aangetoond dat deze ApoE3L.CETP muizen op een hoog vet dieet ook artrose krijgen.

GGO aanvraagnr: 08-090

ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat

Lewis ratten, mannetjes, leeftijd 15 weken oud.

Deze stam wordt in de literatuur meestal gebruikt voor artrosemodellen. De ratten komen van Harlan of Charles River. Mannetjes worden gebruikt (zijn zwaarder en belasten daardoor hun gewrichten meer dan vrouwtjes, zodat de artrose sneller optreedt).

**13. Wat is de herkomst van de dieren:**

X aangekocht van proefdierfokker

O aangekocht elders, **n.l.:**

O overcomplete dieren

X 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:**

X euthanasie ten behoeve van de proef

O 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 van maximaal 6 muizen per type 2L macrolon bak.

Ratten worden per twee gehuisvest in een type 3 macrolon bak.

Voedsel en water ad libitum.

**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) <sup>1</sup>                                     | Aantal dieren <sup>2</sup> | (be)handeling en effecten <sup>3</sup> | Tijdsduur of frequentie <sup>4</sup> | Verwachte mate van ongerief <sup>5</sup> |
|------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| <u>Hoog-vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel</u>       |                            |                                        |                                      |                                          |
| pilot                                                      | 20                         | wegen                                  | 4-7x                                 | 1                                        |
| pilot                                                      | 20                         | 4 uur vasten                           | 2-5x                                 | 1                                        |
| pilot                                                      | 20                         | Bloedafname via staartsnede            | 2-5x                                 | 2                                        |
| pilot                                                      | 20                         | Urine verzamelen                       | 2-5x                                 | 2                                        |
| pilot                                                      | 20                         | Artrose ontwikkeling                   | ~0-8 weken                           | 3                                        |
| 1-13                                                       | 144                        | wegen                                  | 9x                                   | 1                                        |
| 1-13                                                       | 144                        | 4 uur vasten                           | 7x                                   | 1                                        |
| 1-13                                                       | 144                        | Bloedafname via staartsnede            | 7x                                   | 3                                        |
| 1-13                                                       | 144                        | Urine verzamelen                       | 7x                                   | 2                                        |
| 1-13                                                       | 144                        | Artrose ontwikkeling                   | ~16 weken                            | 3                                        |
| 11-13                                                      | 24                         | Compound toediening (2x per week)      | 40x s.c.                             | 2                                        |
| Low responders                                             | 51                         | wegen                                  | 4x                                   | 1                                        |
| Low responders                                             | 51                         | 4 uur vasten                           | 2x                                   | 1                                        |
| Low responders                                             | 51                         | Bloedafname via staartsnede            | 2x                                   | 2                                        |
| Alle groepen                                               | 215                        | Euthanasie dmv CO <sub>2</sub>         | 1x                                   | 1                                        |
| <u>Unilateraal ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat</u> |                            |                                        |                                      |                                          |
| Oefengroep                                                 | 6                          | Operatie onder isofluraan anesthesie   | 1x                                   | 3                                        |
| Oefengroep                                                 | 6                          | s.c. injectie (pijnstilling +          | 13x                                  | 2                                        |

|              |    |                                              |                                                        |   |
|--------------|----|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---|
|              |    | glucose bolus)                               |                                                        |   |
| 1-9          | 90 | Operatie onder isofluraan anesthesie         | 1x                                                     | 3 |
| 1-9          | 90 | wegen                                        | 6x                                                     | 1 |
| 1-9          | 90 | s.c. injectie (pijnstilling + glucose bolus) | 13x                                                    | 2 |
| 1-9          | 90 | Bloedafname via staartsnede onder            | 8x                                                     | 2 |
| 1-9          | 90 | Urine verzamelen mbv metabole kooien         | 5x                                                     | 3 |
| 1-9          | 90 | Artrose ontwikkeling                         | 14 weken                                               | 3 |
| 5-9          | 50 | i.a. injectie onder isofluraanesthesie       | 12x<br>(6x hiervan kan samenvallen met de bloedafname) | 3 |
| Alle groepen | 96 | Euthanasie dmv CO <sub>2</sub>               | 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) <sup>1</sup> | Aantal dieren <sup>2</sup> | Totaal ongerief <sup>6</sup> |
|------------------------|----------------------------|------------------------------|

| <u>Hoog-vet dieet-geïnduceerde artrose muismodel</u>       |     |   |
|------------------------------------------------------------|-----|---|
| pilot                                                      | 20  | 3 |
| 1-13                                                       | 144 | 3 |
| Low responders                                             | 51  | 2 |
|                                                            |     |   |
| <u>Unilateraal ACLT/Mnx geïnduceerde artrose in de rat</u> |     |   |
| oefen                                                      | 6   | 3 |
| 1-9                                                        | 90  | 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 bloedafname via de staart wordt geen anesthesie toegepast, omdat dit meer belastend wordt geacht dan de bloedafname zelf.

De ACLT/Mnx operatie wordt onder isofluraan anesthesie uitgevoerd. Ten behoeve van deze operatie wordt 1 dag voorafgaand pijnstilling toegediend en vervolgens nog 3 dagen na de operatie. Het soort pijnstilling zal met de proefdierdeskundige worden afgestemd. Tot op heden is hiervoor temgesic gebruikt (2x per dag s.c.).

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

Er worden geen ernstige effecten in de deze studie verwacht, maar bij onverwachte tekenen van ziekte (gewichtsafname > 20%, pilo erectie, afscheiding rond de ogen) wordt bij deze dieren voortijdig euthanasie toegepast.

**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 voorgaande studies met ApoE3L.CETP muizen op een hoog vet dieet blijkt dat er geen bijkomende risico's te verwachten zijn. De diverse behandelingen met uitzondering van cyclodextrine zijn eerder toegepast binnen diverse TNO modellen zonder complicaties. In het ACLT/Mnx model echter nog niet, maar op grond van de ervaringen met de muismodellen verwachten we het niet. Polysulphated cyclodextrine is eerder door de co-financier toegepast in een muismodel voor artrose zonder complicaties en de doses die gebruikt gaan worden zullen geven geen toxische effecten in de rat.

**ALTERNATIEVEN**

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

**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 lipidenmetabolisme en de invloed op artrose ontwikkeling kan dit alleen worden onderzocht in intacte diermodellen en bestaan er geen alternatieve methoden om deze complexe metabole processen te onderzoeken.

Daarnaast is deze studie geïnitieerd om een beter voorspellend model voor artrose te ontwikkelen, aangezien tot op heden de resultaten die behaald zijn met de mechanisch-geïnduceerde modellen niet geleid hebben tot een effectief middel in de kliniek.

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

Naast deze *in vivo* studies wordt ook met behulp van *in vitro* en *ex vivo* systemen (explant van kraakbeen al of niet in combinatie met synovium explants) gekeken naar mogelijke pathways die betrokken zijn bij de ontwikkeling van artrose in deze modellen. Aan de hand hiervan zal gekeken worden of er biomarkers zijn die de effecten van therapie kunnen monitoren.

**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: Intern overleg gevoerd over het design van deze studie. Het ApoE3L.CETP model is besproken met de onderzoekers die al lange tijd ervaring met dit model hebben.

**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.

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

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

OA: OsteoArthritis/artrose

WHO: World Health Organization

s.c.: subcutaan

i.a.: intra-articulair

Onderzoeker

[Redacted]

Management

[Redacted]

datum:

datum:

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