

130

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-062

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 04-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
25-05-2011	Pilot

VROM/GGONR ³
Ig05-36

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1.2.3	1. 2. 3. 4.	1.2.3	1.2.3			
-------------	-------	-------------	-------	-------	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	31961380B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Het effect van plantaardige sterolen en stanolen op het cholesterol metabolisme.

startdatum Mei 2011

einddatum ⁹ Mei 2013

Duur van de proef¹⁰: 14 wkn

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)			Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				
4. overige uitvoerenden			Art.9	
5.			Art.12	

Diergroep	1	2					
ctrl/exp/sham	exp	exp					
Diersoort	01	01					
Stam	C57Bl6	C57bl6					
Construct / mutatie ?	LDLR-/-	LDLR-/-					
Herkomst (leverancier) *	01	01					
Aantal	7	32					
Geslacht	v	m/v					
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja					
Leeftijd/gewicht	Afhankelijk van de fok	0 wkn					
Doel van de proef *	33	33					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	01	01					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	02	03					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Het effect van plantaardige sterolen en stanolen op het cholesterol metabolisme.

1. Doel van de proef.

In een voorgaande studie (decnr 2009-129) hebben we de serum concentraties van plantaardige sterolen, stanolen en cholesterol in de uren na een orale gavage (plantaardige stanolesters in olijfolie) bestudeerd. We zagen in de C57Bl6 muizer

(-40% 120 minuten post-gavage). Dit acute effect is in eerdere studies nooit waargenomen omdat er nooit direct in de post-gavage periode gekeken is. Gezien het veronderstelde werkingsmechanisme ligt het voor de hand om een

te zien.

Een andere verklaring voor dit fenomeen zou een toegenomen transintestinale cholesterol excretie (TICE) kunnen zijn. Dit is de actieve secretie van serum cholesterol in het proximale deel van de dunne darm. Er zijn aanwijzingen dat plantaardige stanolesters inderdaad TICE activeren. In de nu voorgestelde korte termijn studie (analyse in de uren post-gavage) is het onmogelijk om TICE zelf te meten. In deze studie willen we echter nagaan welke lipoproteïne fractie verantwoordelijk is voor de in de vorige studie concentratie. Hiertoe zullen we in de nu voorgestelde studie geen gebruik maken van C57Bl6 muizen aangezien we naast cholesterol in de HDL fractie ook cholesterol in andere lipoproteïne fracties nodig hebben om de onderzoeksvraag te beantwoorden. Derhalve krijgen (in lijn met de vorige studie) dit keer LDL-receptor deficiënte muizen een orale gavage van plantaardige stanolen waarna op 8 verschillende tijdstippen (identiek aan het vorige experiment) enkele muizen opgeofferd worden om veranderingen in het lipoproteïne profiel te bepalen. Daarnaast zullen we wederom op elk van deze tijdstippen de concentraties plantaardige sterolen en stanolen in lever- en darmweefsels bepalen en deze concentraties relateren aan de ontwikkelingen in serum totaal cholesterol concentraties als ook de cholesterol verdeling over de lipoproteïne fracties.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Om het risico op hart- en vaatziekten te verlagen, is het actief verlagen van serum (LDL) cholesterolconcentraties een veel gebruikte interventie strategie. Dit kan met behulp van medicatie of door gebruik te maken van functionele voedingsmiddelen, zoals producten verrijkt met plantaardige sterolen en stanolen. Er kan een onderscheid gemaakt worden tussen de VLDL, IDL, LDL (slechte cholesterol) en de HDL (het goede cholesterol) fracties. Deze studie zal het verloop van de fracties in de tijd weergeven om zo na te gaan welke lipoproteïne fractie verantwoordelijk is voor de eerder geobserveerde serum cholesterol daling in de post-gavage periode. Er zijn namelijk recente aanwijzingen dat dit zou lopen via het TICE mechanisme, echter er zijn omtrent dit mechanisme nog vele vragen waaronder de vraag welke lipoproteïne fractie het cholesterol uit de circulatie naar de darm transporteert. Ondanks het feit dat we TICE niet over zo een korte post-gavage periode kunnen meten, geeft de voorgestelde analyse wel een indicatie over de werking ervan. Beter begrip kan op zijn beurt leiden tot de ontwikkeling van effectievere interventies die interveniëren in het cholesterol metabolisme (absorptie/excretie).

3. Alternatieven

Alternatieven voor het in vivo bestuderen van het effect van plantaardige sterolen en stanolen op het intestinale cholesterol metabolisme zijn niet voorhanden. In deze pilot studie zal nagegaan worden welk lipoproteïne verantwoordelijk is voor de daling in de serum cholesterol concentratie. Dit kan niet uitgevoerd worden in wildtype C57bl6 muizen, aangezien bij deze muizen de totale cholesterol fractie aanwezig is in HDL lipoproteïnen. Daarom maken we gebruik van LDL receptor knock-out muizen, waarbij verschillende lipoproteïne fracties (VLDL, IDL, LDL en HDL) opgezuiverd kunnen worden.

4. Ethische afweging

Voor deze studie wordt gebruikt gemaakt van LDL receptor deficiënte muizen. Het voorgestelde onderzoek is niet mogelijk in wildtype muizen, niet in mensen en ook niet in cellijnen.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Plantaardige sterolen en stanolen zijn de plantaardige tegenhanger van cholesterol in het dierenrijk. Aangezien dieren geen plantaardige sterolen en stanolen aanmaken, is per definitie al het in het lichaam aanwezige materiaal afkomstig van de voeding. Celstudies en studies in mensen hebben reeds aangetoond dat plantaardige sterolen en stanolen een effect hebben op het cholesterol metabolisme. In de voorgaande pilot studie (decnr 2009-129) zagen we een

Het doel van deze studie is om, aan de hand van het volgen van de verdeling van cholesterol over de verschillende lipoproteïne fracties, te bepalen welke lipoproteïne fractie verantwoordelijk is voor deze uiterst snelle daling. Om een antwoord op deze vraag te krijgen, zullen LDL receptor deficiënte muizen vanaf hun geboorte gevoed worden met plant sterol en stanol arm voer (hetzelfde als in voorgaande pilot studie). Om ervoor te zorgen dat ze vanaf de geboorte dit voer krijgen, worden de moeders onmiddellijk na werpen gevoed met hetzelfde plant sterol arm voer. Als de nakomelingen 12 weken oud zijn, krijgen ze een orale gavage bestaande uit cholesterol en plantaardige stanolen, opgelost in olijfolie. Vervolgens zullen er op 8 verschillende tijdstippen telkens 4 muizen opgeofferd worden. Deze tijdstippen zijn gekozen op basis van de resultaten uit de voorgaande pilot studie (decnr 2009-129), waarbij er in de tijd een snelle stijging in de plant stanol concentratie in de lever te zien was, gevolgd door een toename in de darm en het serum. Naast de fractionele cholesterol absorptie, zal de kinetiek van plant stanol opname in darm en lever en de serum concentratie van cholesterol, plant sterolen en stanolen op ieder tijdstip bestudeerd worden. Desondanks het feit dat het onmogelijk is om TICE in deze korte termijnstudie te meten, levert het een belangrijke bijdrage aan het ontrafelen van het werkingsmechanisme ervan.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit protocol is niet specifiek wetenschappelijk beoordeeld door een onafhankelijke commissie. Dit **DEC protocol** is wel beoordeeld en akkoord bevonden door

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

LDL receptor knock-out muizen, fok UM, gedood door hartpunctie

7b. Sexe

In de eerste fase zullen 7 vrouwtjes ingezet worden in een fok. De 32 nakomelingen (man en vrouw) zullen gemengd worden verdeeld over de verschillende tijdstippen.

7c. Aantallen

Op basis van de voorgaande pilot studie, is er gekozen voor 8 verschillende tijdstippen met telkens 4 muizen per groep. Dit brengt ons op een totaal van $8 \times 4 = 32$ muizen.

Om het aantal moeders en zo de variatie tussen de pups zo klein mogelijk te houden, zullen we hele nesten nemen. We zullen, uitgaande van een gemiddelde van 5 pups per nest, 7 nesten nodig hebben. De 7 moeders zullen vanaf het werpen tot aan het spenen gevoed worden met hetzelfde plant sterol arm voer.

In totaal: 7 vrouwtjes + 32 nakomelingen = 39 dieren

5 Dierproef

8. Experiment

In deze studie worden 32 LDL receptor deficiënte pups onmiddellijk na de geboorte gevoed met plant sterol arm voer. Dit houdt in dat de moeders, vanaf het werpen tot aan het spenen gevoed worden met hetzelfde plant sterol arm voer. De overschakeling naar dit speciaal dieet leidt niet tot extra belasting. Het is exact hetzelfde voer als datgene gebruikt in voorgaande pilot studie (decnr 2009-129). Als de nakomelingen 12 weken oud zijn, krijgen ze een intraveneuze toediening van cholesterol-D7, gevolgd door een orale gavage bestaande uit cholesterol-D5 en plantaardige stanolesters (1%w/w) opgelost in een plant sterolarme olijfolie. Vervolgens zullen op tijdstippen 0,15,30,60,120,180,240 en 480 minuten post-gavage telkens 4 muizen opgeofferd worden. Mannen en vrouwen zullen gemengd worden verdeeld over de verschillende groepen. 2 uur voor de gavage en na de gavage blijven de muizen gevestigd tot opoffering. Zo kunnen we de veranderingen in het lipoproteïne profiel en de kinetiek van de plant stanol opname zo gestandaardiseerd mogelijk over de volledige periode van 8 uur bepalen.

Na opoffering dmv hartpunctie op de aangegeven tijdstippen wordt het bloed verzameld. Na perfusie met fysiologisch zout om het laatste bloed uit de weefsels te spoelen worden direct de lever en de darmen verwijderd. De darminhoud wordt verzameld en vervolgens worden de darmpjes gewassen en verdeeld in het duodenum, jejunum, het ileum en colon segment. Alle weefsels worden na isolatie zo snel mogelijk opgeslagen in vloeibare stikstof.

2u gevestigd	orale gavage		gevestigd						
	T=0	T=15	T=30	T=60	T=120	T=180	T=240	T=480	
			4x	4x	4x	4x	4x	4x	4x

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

wordt niet toegepast.

9b. Pijnbestrijding

Er zullen tijdens het experiment geen operatieve ingrepen plaatsvinden. Tevens is het niet te verwachten dat de muizen door het experiment zelf extra ongerief zullen ondervinden waardoor pijnbestrijding niet nodig is.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De 7 moeders worden na het spenen geofferd dmv CO₂/O₂
- De 32 nakomelingen worden in week 12 na de orale gavage opgeofferd onder anesthesie (isofluran 1-2%) dmv hartpunctie en doorknippen van het middenrif.

Humane eindpunten:

Het toegediende voedsel geeft normaal geen ziektebeeld of enige vorm van lijden voor het dier. Mocht er zich, door eventuele andere factoren, een situatie voordoen dat het dier blijkt te lijden, en er dus sprake is van overschrijding van de humane eindpunten, zal het dier voor het einde van de proef worden afgemaakt. De normale parameters, zoals exploratief gedrag, gezonde vacht, normale houding, geen gewichtsverlies >20% en dergelijke zullen hierbij in acht genomen worden.

Zorg

10a. Ongerief

Alle dieren worden in groepsverband gehuisvest. Het milde dieet brengt geen extra belasting met zich mee (ongerief code 01). De 7 vrouwtjes zullen na het spenen opgeofferd worden mbv CO₂/O₂ (ongerief code 02).

De 32 nakomelingen ondergaan een gavage (ongerief code 02), gevolgd door hartpunctie (ongerief code 02). Voor de muizen die in een tijdreeks tot 8 uur gevestigd worden, geldt ook een ongerief score 02. De totale ongeriefscore komt hiermee voor dit project op 02.

10b. Welzijnsevaluatie

Gedurende het experiment zal het welzijn van de dieren in de gaten worden gehouden door de VO alsmede door de medewerkers van het CPV.

11. Verzorging en huisvesting

- Dagelijkse verzorging vindt plaats door de medewerkers van de Centrale Proefdiervoorzieningen.
- Huisvesting vindt plaats in de ruimten van de centrale proefdiervoorziening van de Universiteit Maastricht. De muizen worden in groepsverband gehuisvest.
- De opoffering van de 7 vrouwtjes onder CO₂/O₂ en de gavage alsmede de opoffering onder anesthesie (isofluran 1-2%) van de 32 nakomelingen zullen worden uitgevoerd door medewerkers van het CPV.

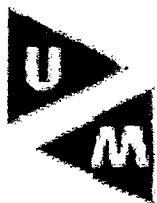
12. Deskundigheid

De onderzoeker is art.9. Overige handelingen worden verricht door biotechnici van het CPV (art.12).

13. Standard Operation Procedures (SOP)

nvt

Relevante literatuur



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Het effect van plantaardige sterolen en stanolen op het cholesterol metabolisme*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 6 "Het huidige idee" aan te passen in "dit DEC protocol" is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door....
- De DEC merkt op dat verder onderzoek, volgend op deze experimenten, als een nieuwe aanvraag ingediend wordt en niet langer als pilot.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in **een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.**

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer **2011-062**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Beste,

Mijn projectaanvraag: 'Het effect van plantaardige sterolen en stanolen op het cholesterol metabolisme' is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken. Het staat geregistreerd onder het nummer 2011-062.

U vroeg me om punt 6 van de aanvraag aan te passen. *Het huidige idee* heb ik vervangen door dit dec protocol is wel beoordeeld en akkoord bevonden door

Met vriendelijke groeten,

PhD-student

Aan: J

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
29-05-2011

Project: *Het effect van plantaardige sterolen en stanolen op het cholesterol metabolisme.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T (043)

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies, met de opmerking dat verder onderzoek, volgend op deze experimenten, als een nieuwe aanvraag ingediend dienen te worden en niet als pilot.**

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-062
Diersoort: muis
Aantal dieren: 39
Einddatum: 25-05-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

~~Vice-Voorzitter DEC-UM~~