

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Invloed van verschillende voeren op ontsteking in Fiaf Ko muizen

Aanmeldcode / Protocol: 2008104.a

Stadia van de proef:

05-11-2008	Aangemeld	
20-11-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
05-12-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek maakt deel uit van een project binnen het

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

Afgelopen jaar heeft onderzoek van onze groep aangetoond dat muizen waarin Fiaf gen geïnactiveerd is (zg. Fiaf knock-out muizen) ernstige gezondheidsproblemen ontwikkelen na >12 weken op hoog vet voer (45 energie% vet, in de vorm van palmolie). De dieren vallen af, ontwikkelen buikvocht en buikvliesontsteking en sterven na 14-24 weken. Fiaf KO muizen die laag vet voer krijgen ontwikkelen opvallend genoeg helemaal geen problemen. Het sterke vermoeden bestaat dat deze negatieve spiraal het gevolg is van een uit de hand gelopen ontsteking die we na 8 weken duidelijk in de lever en het bloed kunnen waarnemen (verhoging ontstekingsmediatoren, acute fase reactie). Het doel van de proef is om erachter te komen wat nu precies deze ontsteking veroorzaakt en in hoeverre deze gerelateerd is aan specifieke bestanddelen in de voeding. Om daarin beter inzicht te krijgen willen we de effecten van verschillende soorten voer op ontsteking vergelijken. De voeder zijn zodanig gekozen dat we de invloed van vetzuursamenstelling, hoeveelheid vet, en manier van vetabsorptie (portaal vene vs. lymfe) kunnen bepalen.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Fiaf is een door diverse weefsels geproduceerd hormoon dat inwerkt op de stofwisseling van vetten en koolhydraten. Onderzoek van onze groep en andere groepen heeft laten zien dat Fiaf een belangrijke rol speelt bij de regulatie van het vet (triglyceriden) en in mindere mate cholesterol gehalte in het bloed. Aangezien een verhoogd vet en cholesterol gehalte in het bloed risicofactoren zijn voor de ontwikkeling van slagaderverkalking (atherosclerose) kan onderzoek naar Fiaf aangrijpingspunten leveren voor de behandeling van slagaderverkalking. Tevens geeft het inzicht in de oorzaak van slagaderverkalking. Recentelijk is echter duidelijk geworden dat Fiaf ook specifiek in de dunne darm wordt geproduceerd (en dus als darmhormoon kan worden gekenschetst) en daar invloed heeft op darmonsteking. Wellicht heeft Fiaf invloed op de afweerrespons in de darm en tevens de doorlaatbaarheid van de darm van ongewenste bacteriën, al is onze kennis op dit moment nog beperkt en is extra onderzoek noodzakelijk. Onderzoek

naar de rol van Fiaf in darm kan bijdragen aan het beter begrijpen van het ontstaan van ontstekingsziekten in de darm en eveneens mogelijke aangrijpingspunten opleveren voor de behandeling hiervan.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 20-12-2008 tot 19-12-2009

3. Specificatie diergroepen:

wildtype LFD	10	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD palm oil 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD lard 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD safflower oil 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD medium chain TG 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD palm oil 25en%	10	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO LFD	10	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD lard 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	10		<<< Error: Value could not be decoded: 0 >>>
<<< Error: Merge field started but no ending code used >>><#Tpsubspec.HoofdDierSpec>			
<#Tpsubspec.Omschrijving>			
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	10	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	10	muizen	C57Bl/6 males

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Het betreft Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond. Deze muizen missen een deel van het Fiaf gen waardoor ze geen functioneel Fiaf hormoon meer aanmaken.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Om het chronische effect van Fiaf te bestuderen zijn muizen die geen Fiaf aanmaken (zogenaamde knock out muizen) uitermate waardevol. Knock-outs van Fiaf zijn alleen gemaakt en beschikbaar in de muis.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Aangezien C57Bl/6 muizen flink variëren in hun respons op hoog vet voer zijn minimaal 8 muizen nodig om statistische betrouwbare uitspraken te kunnen doen. Dit getal is gebaseerd op ervaring in eerder onderzoek. Om eventuele uitval te ondervangen is zijn daarom 10 muizen per groep noodzakelijk.

4.d. Herkomst:

wildtype LFD	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD palm oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD lard 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD safflower oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD medium chain TG 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD palm oil 25en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO LFD	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD lard 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De Fiaf knock-out muizen zijn vervaardigd door het farmaceutisch bedrijf [REDACTED]

De muizen zijn via [REDACTED]

geïmporteerd. Binnen het [REDACTED] is een colonie opgebouwd.

5.a. Accommodatie:

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

De dieren zullen worden gehuisvest volgens het standaardprotocol van het [REDACTED] (dus niet individueel)

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De dieren zullen extra aandacht ontvangen om eventuele gezondheidsproblemen op tijd te detecteren. Belangrijkste criterium is gewichtsverlies en tevens algemene malaise (lethargisch, slechte vacht, anorexia). Deze gaan waarschijnlijk vooraf aan de ontwikkeling van buikvocht en buikvliesontsteking. Het tijdstip van opoffering is echter zodanig gekozen dat het optreden van deze gezondheidsproblemen vermeden zou moeten worden.

5.c. Voeding:

De dieren ontvangen voeders die gebaseerd zijn op het D12451 voer van Research Diets. Daarbij is het vet afkomstig van ofwel reuzel, palm olie, saffloer olie of cocosolie (24 gr/100g, 45en%). Het 12450B voer van Research Diets fungeert als controle dieet (laag vet voer).

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

Mannelijke wildtype C57Bl/6 muizen en Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond in de leeftijd van 9-15 weken zullen gedurende 2 weken op een run-in voer gezet worden (D12450B). Vervolgens worden de muizen op één van de 6 verschillende voeren worden gezet (10 muizen per voer per genotype). Water en voer zijn beide ad libitum beschikbaar. De dieren zullen niet individueel worden gehuisvest. Het gewicht van de dieren en de voerconsumptie zal elke week gemeten worden. Tevens zal elke week een geringe hoeveelheid bloed worden afgenomen via de staart (25 uL) voor bepaling van het acute phase eiwit Serum Amyloid. Na 3 weken zal feces worden verzameld gedurende 48 uur. De dieren zullen na 8 weken worden opgeofferd. Uit eerdere experimenten is gebleken dat de Fiaf-Ko dieren na 8 weken hoog vet voer (palm olie) subklinische ontsteking laten zien, wat gepaard gaat met sterk verhoogde Serum Amyloid waarden. De ontwikkeling van klinische kenmerken (buikvocht, anorexia, cachexia, buikvliesontsteking) treedt echter pas op na 12 weken op hoog vet voer (palmolie).

Op grond van eerdere experimenten verwachten we dus niet dat deze klinische kenmerken zullen optreden tot 8 weken al is het niet uit te sluiten dat een bepaald type voer de ontwikkeling van klinische kenmerken zal versnellen tov. het hoog vet palmolie voer. Door middel van de wekelijkse meting van Serum Amyloid kunnen de ontwikkelingen in de verschillende dieren echter nauwgezet in de gaten gehouden worden. Mocht er sprake zijn van een versnelde ontwikkeling van ontsteking op een bepaalde type voer (tov. hoog vet palmolie) dan zullen alle dieren al op een eerder tijdstip opgeofferd worden. Het criterium dat daarbij gehanteerd wordt is een gemiddelde serum amyloid waarde >1000 ug/mL.

Aan het eind van de proef zullen de dieren verdoofd worden mbv. isofluraan. Vervolgens zal onder verdoving the poortader aangeprikt worden voor verzameling van een klein bloedmonster. Hierin zullen endotoxinen worden gemeten. Vervolgens zal een orbitapunctie worden uitgevoerd om totaal bloed te verzamelen, waarna de dieren via cervicale dislocatie worden gedood. Vervolgens worden diverse weefsels (lymfknoten, nieren, huid, lever, darm, skeletspier, hart, vetweefsel, bloed) verzameld voor uitgebreide vervolg analyse waaronder genexpressie analyse, metabolomics, and histologie.

6.b. Mate van ongerief:

wildtype LFD	B. Gering/Matig
wildtype HFD palm oil 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD lard 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD safflower oil 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD medium chain TG 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD palm oil 25en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO LFD	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	B. Gering/Matig

Fiaf-KO HFD lard 45en% B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD palm oil 25en% B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Aangezien de dieren zullen worden opgeofferd voordat klinische verschijnselen zich gaan openbaren zal het ongerief beperkt zijn.

Dieetinterventie: gering

Wekelijkse bloedafname via staart: gering/matig

Orbitapunctie en poortader punctieonder verdoving, plus opoffering: gering/matig

Cumulatief: gering/matig

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

wildtype LFD D. Is wel toegepast.
wildtype HFD palm oil 45en% D. Is wel toegepast.
wildtype HFD lard 45en% D. Is wel toegepast.
wildtype HFD safflower oil 45en% D. Is wel toegepast.
wildtype HFD medium chain TG 45en% D. Is wel toegepast.
wildtype HFD palm oil 25en% D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO LFD D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO HFD palm oil 45en% D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO HFD lard 45en% D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% D. Is wel toegepast.
Fiaf-KO HFD palm oil 25en% D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

wildtype LFD A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
wildtype HFD palm oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
wildtype HFD lard 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
wildtype HFD safflower oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
wildtype HFD medium chain TG 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
wildtype HFD palm oil 25en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO LFD A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO HFD palm oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO HFD lard 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Fiaf-KO HFD palm oil 25en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de dieetinterventie te beperken tot maximaal 8 weken wordt de ontwikkeling van klinische kenmerken vermeden. Mocht een groep al in een eerder stadium sterk verhoogde serum amyloid waarden vertonen (gemiddeld boven 1000 ug/mL) dan zullen alle dieren vervolgens zo snel mogelijk opgeofferd worden voor verzameling weefsels etc.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

wildtype LFD Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.

wildtype HFD palm oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 wildtype HFD lard 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 wildtype HFD safflower oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 proef. wildtype HFD medium chain TG 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 proef. wildtype HFD palm oil 25en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 Fiaf-KO LFD Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD palm oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD lard 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 proef. Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.
 proef. Fiaf-KO HFD palm oil 25en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.

Toelichting:

De dieren zullen aan het eind van de proef worden opgeofferd voor verzameling bloed en weefsels

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Omdat nog onvoldoende bekend is over de achtergrond van de effecten van Fiaf op darm en algemene ontsteking is het nog niet mogelijk te beoordelen welk in vitro systeem geschikt zou zijn als model om de effecten van Fiaf op ontsteking en immuunfunctie verder te onderzoeken. Door te proberen het mechanisme verder uit te diepen kan in de toekomst mogelijk gericht het effect van Fiaf op bepaalde cellen worden bestudeerd. We hebben overwogen om de wildtype muizen weg te laten aangezien deze op geen van de dieeten een ontsteking zullen ontwikkelen. Om echter binnen elk dieet een directe vergelijking tussen wildtype en Fiaf KO muizen mogelijk te maken hebben we er toch voor gekozen om voor elk dieet ook de wildtype muizen mee te nemen.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008104.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
wildtype LFD	1	01	1	10					01	4	1	2	1
wildtype HFD palm oil 45en%	1	01	1	10					01	4	1	2	1
wildtype HFD lard 45en%	1	01	1	10					01	4	1	2	1
wildtype HFD safflower oil 45en%	1	01	1	10						01	4	1	2
wildtype HFD medium chain TG 45en%	1	01	1	10	1	10					01	4	1
wildtype HFD palm oil 25en%	1	01	1	10					01	4	1	2	1
Fiaf-KO LFD	2	01	1	10					01	4	1	2	1
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	2	01	1	10					01	4	1	2	1
Fiaf-KO HFD lard 45en%	2	01	1	10					01	4	1	2	1
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	2	<<< Error: Value could not be decoded: 0 >>> <<< Error: Merge field started but no ending code used >>><#Tpsubspec.Eerder> <#Tpsubspec.HoofdAantal>											
									<#Tpsubspec.bijztech(QTechNr)> <#Tpsubspec.anesthesie>				
									<#Tpsubspec.bestongc> <#Tpsubspec.ongerief> <#Tpsubspec.eindtoestand>				
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	2	01	1	10						01	4	1	2
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	2	01	1	10					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

[Redacted]

Aanvrager:
Afdeling:

[Redacted]

Titel dierproef: Invloed van verschillende voeren op ontsteking in Fiaf Ko muizen

Aanmeldcode / Protocol: 2008104.b

Stadia van de proef:

05-12-2008	Aangemeld	[Redacted]
09-12-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
09-12-2008	Gekopieerd	[Redacted]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek maakt deel uit van een project binnen het [Redacted]

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

Afgelopen jaar heeft onderzoek van onze groep aangetoond dat muizen waarin Fiaf gen geïnactiveerd is (zg. Fiaf knock-out muizen) ernstige gezondheidsproblemen ontwikkelen na >12 weken op hoog vet voer (45 energie% vet, in de vorm van palmolie). De dieren vallen af, ontwikkelen buikvocht en buikvliesontsteking en sterven na 14-24 weken. Fiaf KO muizen die laag vet voer krijgen ontwikkelen opvallend genoeg helemaal geen problemen. Het sterke vermoeden bestaat dat deze negatieve spiraal het gevolg is van een uit de hand gelopen ontsteking die we na 8 weken duidelijk in de lever en het bloed kunnen waarnemen (verhoging ontstekingsmediatoren, acute fase reactie). Het doel van de proef is om erachter te komen wat nu precies deze ontsteking veroorzaakt en in hoeverre deze gerelateerd is aan specifieke bestanddelen in de voeding. Om daarin beter inzicht te krijgen willen we de effecten van verschillende soorten voer op ontsteking vergelijken. De voeder zijn zodanig gekozen dat we de invloed van vetzuursamenstelling, hoeveelheid vet, en manier van vetabsorptie (portaal vene vs. lymfe) kunnen bepalen.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Fiaf is een door diverse weefsels geproduceerd hormoon dat inwerkt op de stofwisseling van vetten en koolhydraten. Onderzoek van onze groep en andere groepen heeft laten zien dat Fiaf een belangrijke rol speelt bij de regulatie van het vet (triglyceriden) en in mindere mate cholesterol gehalte in het bloed. Aangezien een verhoogd vet en cholesterol gehalte in het bloed risicofactoren zijn voor de ontwikkeling van slagaderverkalking (atherosclerose) kan onderzoek naar Fiaf aangrijpingspunten leveren voor de behandeling van slagaderverkalking. Tevens geeft het inzicht in de oorzaak van slagaderverkalking. Recentelijk is echter duidelijk geworden dat Fiaf ook specifiek in de dunne darm wordt geproduceerd (en dus als darmhormoon kan worden gekenschetst) en daar invloed heeft op darmonsteking. Wellicht heeft Fiaf invloed op de afweerrespons in de darm en tevens de doorlaatbaarheid van de darm van ongewenste bacteriën, al is onze kennis op dit moment nog beperkt en is extra onderzoek noodzakelijk. Onderzoek

naar de rol van Fiaf in darm kan bijdragen aan het beter begrijpen van het ontstaan van ontstekingsziekten in de darm en eveneens mogelijke aangrijpingspunten opleveren voor de behandeling hiervan.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 20-12-2008 tot 19-12-2009

3. Specificatie diergroepen:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
wildtype HFD palm oil 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
wildtype HFD lard 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
wildtype HFD safflower oil 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
wildtype HFD medium chain TG 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
wildtype HFD palm oil 25en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
Fiaf-KO HFD lard 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	9	<<< Error: Value could not be decoded: 0 >>>			
<<< Error: Merge field started but no ending code used >>><#Tpsubspec.HoofdDierSpec>					
<#Tpsubspec.Omschrijving>					
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males		
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	9	muizen	C57Bl/6 males		

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Het betreft Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond. Deze muizen missen een deel van het Fiaf gen waardoor ze geen functioneel Fiaf hormoon meer aanmaken.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Om het chronische effect van Fiaf te bestuderen zijn muizen die geen Fiaf aanmaken (zogenaamde knock out muizen) uitermate waardevol. Knock-outs van Fiaf zijn alleen gemaakt en beschikbaar in de muis.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Aangezien C57Bl/6 muizen flink variëren in hun respons op hoog vet voer zijn minimaal 8 muizen nodig om statistische betrouwbare uitspraken te kunnen doen. Dit getal is gebaseerd op ervaring in eerder onderzoek. Om eventuele uitval op te kunnen vangen zijn daarom 9 muizen per groep noodzakelijk.

4.d. Herkomst:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD palm oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD lard 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD safflower oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD medium chain TG 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD palm oil 25en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD lard 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De Fiaf knock-out muizen zijn vervaardigd door het farmaceutisch bedrijf [REDACTED]

De muizen zijn via [REDACTED]

geïmporteerd. Binnen het [REDACTED] is een colonie opgebouwd.

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

Dieren ontvangen standaard verzorging.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De dieren zullen extra aandacht ontvangen om eventuele gezondheidsproblemen op tijd te detecteren. Belangrijkste criterium is gewichtsverlies en tevens algemene malaise (lethargisch, slechte vacht, anorexia). Deze gaan waarschijnlijk vooraf aan de ontwikkeling van buikvocht en buikvliesontsteking. Het tijdstip van opoffering is echter zodanig gekozen dat het optreden van deze gezondheidsproblemen vermeden zou moeten worden.

5.c. Voeding:

De dieren ontvangen voeders die gebaseerd zijn op het D12451 voer van Research Diets. Daarbij is het vet afkomstig van ofwel reuzel, palm olie, saffloer olie of cocosolie (24 gr/100g, 45en%). Het 12450B voer van Research Diets fungeert als controle dieet (laag vet voer).

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

Mannelijke wildtype C57Bl/6 muizen en Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond in de leeftijd van 9-15 weken zullen gedurende 2 weken op een run-in voer gezet worden (D12450B). Vervolgens worden de muizen op één van de 6 verschillende voeren worden gezet (9 muizen per voer per genotype). Water en voer zijn beide ad libitum beschikbaar. De dieren zullen niet individueel worden gehuisvest. Het gewicht van de dieren en de voerconsumptie zal elke week gemeten worden. Tevens zal elke week een geringe hoeveelheid bloed worden afgenomen via de staart (25 uL) voor bepaling van het acute phase eiwit Serum Amyloid. Na 3 weken zal feces worden verzameld gedurende 48 uur. De dieren zullen na 8 weken worden opgeofferd. Uit eerdere experimenten is gebleken dat de Fiaf-Ko dieren na 8 weken hoog vet voer (palm olie) subklinische ontsteking laten zien, wat gepaard gaat met sterk verhoogde Serum Amyloid waarden. De ontwikkeling van klinische kenmerken (buikvocht, anorexia, cachexia, buikvliesontsteking) treedt echter pas op na 12 weken op hoog vet voer (palmolie).

Op grond van eerdere experimenten verwachten we dus niet dat deze klinische kenmerken zullen optreden tot 8 weken al is het niet uit te sluiten dat een bepaald type voer de ontwikkeling van klinische kenmerken zal versnellen tov. het hoog vet palmolie voer. Door middel van de wekelijkse meting van Serum Amyloid kunnen de ontwikkelingen in de verschillende dieren echter nauwgezet in de gaten gehouden worden. Mocht er sprake zijn van een versnelde ontwikkeling van ontsteking op een bepaalde type voer (tov. hoog vet palmolie) dan zullen alle dieren al op een eerder tijdstip opgeofferd worden. Het criterium dat daarbij gehanteerd wordt is een gemiddelde serum amyloid waarde >1000 ug/mL.

Aan het eind van de proef zullen de dieren verdoofd worden mbv. isofluraan. Vervolgens zal een orbitapunctie worden uitgevoerd om totaal bloed te verzamelen (300 uL), waarna de dieren via cervicale dislocatie worden gedood. Daarna zal de poortader aangeprikt worden voor verzameling van een klein bloedmonster. Door het volume van het bloedmonster bij de orbitapunctie tot 300 uL te beperken blijft voldoende bloed achter in de poortader om te kunnen verzamelen. In het poortaderbloed zullen endotoxinen worden gemeten. Vervolgens worden diverse weefsels (lymfknoepen, nieren, huid, lever, darm, skeletspier, hart, vetweefsel, bloed) verzameld voor uitgebreide vervolg analyse waaronder genexpressie analyse, metabolomics, and histologie.

De reden om ook wildtype muizen mee te nemen in de proef is dat we voor elk voer een directe vergelijking willen kunnen maken tussen wildtype en Angptl4 KO. Weliswaar zou het aanbieden van de verschillende voeren aan alleen de Angptl4 Ko muizen voldoende zijn om te beoordelen welke dieetsamenstelling leidt tot ontwikkeling van ontstekingsverschijnselen, echter om het specifieke effect van het ontbreken van Angptl4 te kunnen vaststellen is het includeren van wildtype muizen noodzakelijk. Temeer omdat we deze nieuwe proef willen benutten om verder inzicht te krijgen in de gevolgen van het ontbreken van Angptl4 voor specifieke aspecten van de darmfunctie (met name immuniteit). Met de inzichten die in de vorige proeven zijn opgedaan zijn nieuwe ideeën ontstaan voor verder onderzoek die verzameling van nieuw weefselmateriaal op specifieke tijdstippen vereisen. We hebben de mogelijkheid overwogen om de huidige dierproef als pilot in te richten, daarbij alleen gebruik makend van de Angptl4

KO muizen. De verwachting was echter dat het uiteindelijke aantal te gebruiken dieren (d.w.v. inclusief vervolgprouf) hoger uit zou vallen.

Tot nu toe hebben we waargenomen dat de ontwikkeling van ontsteking optreedt in Angptl4 KO op een voer dat 45 energieprocent vet bevat als palmolie. Dit voer fungeert dus als referentie. Om uit te zoeken wat het belang is van enerzijds het vetpercentage en anderzijds de vetsamenstelling hebben we uitgaande van dit voer telkens maar één parameter veranderd: ofwel hoeveelheid vet, ofwel vetsamenstelling. Voor de beantwoording van onze vraagstelling is het niet nodig de andere voeren ook in 25% vorm aan te bieden. Daarbij zou dit leiden tot een sterke stijging van het aantal te gebruiken dieren.

In eerdere proeven hebben we kunnen vaststellen dat het ontbreken van Angptl4 gepaard gaat met een veranderde immuunfunctie in de darm. Teven zijn er aanwijzingen dat een voer rijk aan vet de samenstelling van de darmflora doet veranderen, zodanig dat sterker een beroep moet worden gedaan op het immuunsysteem in de darm. Onze hypothese is dat veranderingen in de darmflora als gevolg van hoog vet voer niet adequaat kunnen worden opgevangen in de Angptl4 Ko muizen met als gevolg ontwikkeling van infectie. We vermoeden dat een rijke toestroom van endotoxinen van de darm naar de lever in de Angptl4 muizen op hoog vet voer de oorzaak is voor de extreme activatie van de acute fase respons in de lever zoals in eerdere proeven waargenomen. Om te onderzoeken of hiervan inderdaad sprake is willen we een algemene endotoxinen test doen (LAL Chromogenic endotoxin) op het bloed in de poortader. Verder zal aan het eind van de proef de microflora van de darminhoud en van de feces worden geanalyseerd om het effect van de verschillende voeren op darmflora te kunnen onderzoeken.

6.b. Mate van ongerief:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD palm oil 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD lard 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD safflower oil 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD medium chain TG 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD palm oil 25en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD lard 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Aangezien de dieren zullen worden opgeofferd voordat klinische verschijnselen zich gaan openbaren zal het ongerief beperkt zijn.

Dieetinterventie: gering

Wekelijkse bloedafname via staart: gering/matig

Risico optreden klinische verschijnselen: gering/matig (mbv. serum amyloid waarden zullen we ontsteking monitoren en zonodig het beoogde eindpunt (8 weken) vervroegen).

Orbitapunctie en poortader punctieonder verdoving, plus opoffering: gering/matig

Cumulatief: gering/matig

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	D. Is wel toegepast.
wildtype HFD palm oil 45en%	D. Is wel toegepast.
wildtype HFD lard 45en%	D. Is wel toegepast.
wildtype HFD safflower oil 45en%	D. Is wel toegepast.

wildtype HFD medium chain TG 45en% D. Is wel toegepast.
 wildtype HFD palm oil 25en% D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en% D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO HFD palm oil 45en% D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO HFD lard 45en% D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% D. Is wel toegepast.
 Fiaf-KO HFD palm oil 25en% D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

wildtype NFD (normal fat) 10en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 wildtype HFD palm oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 wildtype HFD lard 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 wildtype HFD safflower oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 wildtype HFD medium chain TG 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 wildtype HFD palm oil 25en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO HFD palm oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO HFD lard 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
 Fiaf-KO HFD palm oil 25en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de dieetinterventie te beperken tot maximaal 8 weken wordt de ontwikkeling van klinische kenmerken vermeden. Mocht een groep al in een eerder stadium sterk verhoogde serum amyloid waarden vertonen (gemiddeld boven 1000 ug/mL) dan zullen alle dieren vervolgens zo snel mogelijk opgeofferd worden voor verzameling weefsels etc.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

wildtype NFD (normal fat) 10en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 wildtype HFD palm oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 wildtype HFD lard 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 wildtype HFD safflower oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 wildtype HFD medium chain TG 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 wildtype HFD palm oil 25en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD palm oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD lard 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
 Fiaf-KO HFD palm oil 25en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

Toelichting:

De dieren zullen aan het eind van de proef worden opgeofferd voor verzameling bloed en weefsels

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven

experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Omdat nog onvoldoende bekend is over de achtergrond van de effecten van Fiaf op darm en algemene ontsteking is het nog niet mogelijk te beoordelen welk in vitro systeem geschikt zou zijn als model om de effecten van Fiaf op ontsteking en immuunfunctie verder te onderzoeken. Door te proberen het mechanisme verder uit te diepen kan in de toekomst mogelijk gericht het effect van Fiaf op bepaalde cellen worden bestudeerd. We hebben overwogen om de wildtype muizen weg te laten aangezien deze op geen van de dieeten een ontsteking zullen ontwikkelen. Om echter binnen elk dieet een directe vergelijking tussen wildtype en Fiaf KO muizen mogelijk te maken hebben we er toch voor gekozen om voor elk dieet ook de wildtype muizen mee te nemen.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008104.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
wildtype NFD (normal fat) 10en%	1	01	1	9						01	4	1	2 1
wildtype HFD palm oil 45en%	1	01	1	9					01	4	1	2	1
wildtype HFD lard 45en%	1	01	1	9					01	4	1	2	1
wildtype HFD safflower oil 45en%	1	01	1	9						01	4	1	2 1
wildtype HFD medium chain TG 45en%	1	01	1	9							01	4	1 2 1
wildtype HFD palm oil 25en%	1	01	1	9					01	4	1	2	1
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%2	01	1	9						01	4	1	2	1
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	2	01	1	9					01	4	1	2	1
Fiaf-KO HFD lard 45en%	2	01	1	9					01	4	1	2	1
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	2	<<< Error: Value could not be decoded: 0 >>> <<< Error: Merge field started but no ending code used >>><#Tpsubspec.Eerder> <#Tpsubspec.HoofdAantal>											
	<#Tpsubspec.bijztech(QTechNr)> <#Tpsubspec.anesthesie>												
	<#Tpsubspec.bestongc> <#Tpsubspec.ongerief> <#Tpsubspec.eindtoestand>												
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	2	01	1	9						01	4	1	2 1
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	2	01	1	9					01	4	1	2	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Invloed van verschillende voeren op ontsteking in Fiaf Ko muizen

Aanmeldcode / Protocol: 2008104.c

Stadia van de proef:

09-12-2008	Aangemeld	
09-12-2008	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
22-01-2009	Proef gestart	
27-11-2009	Welzijnsevaluatie aangemaakt	
13-01-2010	Proef gestart	
13-01-2010	Proef beëindigd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek maakt deel uit van een project binnen het

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

Afgelopen jaar heeft onderzoek van onze groep aangetoond dat muizen waarin Fiaf gen geïnactiveerd is (zg. Fiaf knock-out muizen) ernstige gezondheidsproblemen ontwikkelen na >12 weken op hoog vet voer (45 energie% vet, in de vorm van palmolie). De dieren vallen af, ontwikkelen buikvocht en buikvliesontsteking en sterven na 14-24 weken. Fiaf KO muizen die laag vet voer krijgen ontwikkelen opvallend genoeg helemaal geen problemen. Het sterke vermoeden bestaat dat deze negatieve spiraal het gevolg is van een uit de hand gelopen ontsteking die we na 8 weken duidelijk in de lever en het bloed kunnen waarnemen (verhoging ontstekingsmediatoren, acute fase reactie). Het doel van de proef is om erachter te komen wat nu precies deze ontsteking veroorzaakt en in hoeverre deze gerelateerd is aan specifieke bestanddelen in de voeding. Om daarin beter inzicht te krijgen willen we de effecten van verschillende soorten voer op ontsteking vergelijken. De voeder zijn zodanig gekozen dat we de invloed van vetzuursamenstelling, hoeveelheid vet, en manier van vetabsorptie (portaal vene vs. lymfe) kunnen bepalen.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Fiaf is een door diverse weefsels geproduceerd hormoon dat inwerkt op de stofwisseling van vetten en koolhydraten. Onderzoek van onze groep en andere groepen heeft laten zien dat Fiaf een belangrijke rol speelt bij de regulatie van het vet (triglyceriden) en in mindere mate cholesterol gehalte in het bloed. Aangezien een verhoogd vet en cholesterol gehalte in het bloed risicofactoren zijn voor de ontwikkeling van slagaderverkalking (atherosclerose) kan onderzoek naar Fiaf aangrijpingspunten leveren voor de behandeling van slagaderverkalking. Tevens geeft het inzicht in de oorzaak van slagaderverkalking. Recentelijk is echter duidelijk geworden dat Fiaf ook specifiek in de dunne darm wordt geproduceerd (en

dus als darmhormoon kan worden gekenschetst) en daar invloed heeft op darmonsteking. Wellicht heeft Fiaf invloed op de afweerrespons in de darm en tevens de doorlaatbaarheid van de darm van ongewenste bacterien, al is onze kennis op dit moment nog beperkt en is extra onderzoek noodzakelijk. Onderzoek naar de rol van Fiaf in darm kan bijdragen aan het beter begrijpen van het ontstaan van ontstekingsziekten in de darm en eveneens mogelijke aangrijpingspunten opleveren voor de behandeling hiervan.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 20-12-2008 tot 19-12-2009

3. Specificatie diergroepen:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	9	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD palm oil 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD lard 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD safflower oil 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD medium chain TG 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
wildtype HFD palm oil 25en%	9	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	9	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD lard 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	9	<<< Error: Value could not be decoded: 0 >>>	
<<< Error: Merge field started but no ending code used >>><#Tpsubspec.HoofdDierSpec>			
<#Tpsubspec.Omschrijving>			
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	9	muizen	C57Bl/6 males
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	9	muizen	C57Bl/6 males

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Het betreft Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond. Deze muizen missen een deel van het Fiaf gen waardoor ze geen functioneel Fiaf hormoon meer aanmaken.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Om het chronische effect van Fiaf te bestuderen zijn muizen die geen Fiaf aanmaken (zogenaaamde knock out muizen) uitermate waardevol. Knock-outs van Fiaf zijn alleen gemaakt en beschikbaar in de muis.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Aangezien C57Bl/6 muizen flink variëren in hun respons op hoog vet voer zijn minimaal 8 muizen nodig om statistische betrouwbare uitspraken te kunnen doen. Dit getal is gebaseerd op ervaring in eerder onderzoek. Om eventuele uitval op te kunnen vangen zijn daarom 9 muizen per groep noodzakelijk.

4.d. Herkomst:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD palm oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD lard 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD safflower oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD medium chain TG 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
wildtype HFD palm oil 25en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD lard 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

De Fiaf knock-out muizen zijn vervaardigd door het farmaceutisch bedrijf [REDACTED]. De muizen zijn via [REDACTED] geïmporteerd. Binnen het [REDACTED] is een colonie opgebouwd.

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

Dieren ontvangen standaard verzorging.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De dieren zullen extra aandacht ontvangen om eventuele gezondheidsproblemen op tijd te detecteren. Belangrijkste criterium is gewichtsverlies en tevens algemene malaise (lethargisch, slechte vacht, anorexia). Deze gaan waarschijnlijk vooraf aan de ontwikkeling van buikvocht en buikvliesontsteking. Het tijdstip van opoffering is echter zodanig gekozen dat het optreden van deze gezondheidsproblemen vermeden zou moeten worden.

5.c. Voeding:

De dieren ontvangen voeders die gebaseerd zijn op het D12451 voer van Research Diets. Daarbij is het vet afkomstig van ofwel reuzel, palm olie, saffloer olie of cocosolie (24 gr/100g, 45en%). Het 12450B voer van Research Diets fungeert als controle dieet (laag vet voer).

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

Mannelijke wildtype C57Bl/6 muizen en Fiaf knock-out muizen op C57Bl/6 achtergrond in de leeftijd van 9-15 weken zullen gedurende 2 weken op een run-in voer gezet worden (D12450B). Vervolgens worden de muizen op één van de 6 verschillende voeren worden gezet (9 muizen per voer per genotype). Water en voer zijn beide ad libitum beschikbaar. De dieren zullen niet individueel worden gehuisvest. Het gewicht van de dieren en de voerconsumptie zal elke week gemeten worden. Tevens zal elke week een geringe hoeveelheid bloed worden afgenomen via de staart (25 uL) voor bepaling van het acute phase eiwit Serum Amyloid. Na 3 weken zal feces worden verzameld gedurende 48 uur. De dieren zullen na 8 weken worden opgeofferd. Uit eerdere experimenten is gebleken dat de Fiaf-Ko dieren na 8 weken hoog vet voer (palm olie) subklinische ontsteking laten zien, wat gepaard gaat met sterk verhoogde Serum Amyloid waarden. De ontwikkeling van klinische kenmerken (buikvocht, anorexia, cachexia, buikvliesontsteking) treedt echter pas op na 12 weken op hoog vet voer (palmolie).

Op grond van eerdere experimenten verwachten we dus niet dat deze klinische kenmerken zullen optreden tot 8 weken al is het niet uit te sluiten dat een bepaald type voer de ontwikkeling van klinische kenmerken zal versnellen tov. het hoog vet palmolie voer. Door middel van de wekelijkse meting van Serum Amyloid kunnen de ontwikkelingen in de verschillende dieren echter nauwgezet in de gaten gehouden worden. Mocht er sprake zijn van een versnelde ontwikkeling van ontsteking op een bepaalde type voer (tov. hoog vet palmolie) dan zullen alle dieren al op een eerder tijdstip opgeofferd worden. Het criterium dat daarbij gehanteerd wordt is een gemiddelde serum amyloid waarde >1000 ug/mL.

Aan het eind van de proef zullen de dieren verdoofd worden mbv. isofluraan. Vervolgens zal een orbitapunctie worden uitgevoerd om totaal bloed te verzamelen (300 uL), waarna de dieren via cervicale dislocatie worden gedood. Daarna zal de poortader aangeprikt worden voor verzameling van een klein bloedmonster. Door het volume van het bloedmonster bij de orbitapunctie tot 300 uL te beperken blijft voldoende bloed achter in de poortader om te kunnen verzamelen. In het poortaderbloed zullen endotoxinen worden gemeten. Vervolgens worden diverse weefsels (lymfknoten, nieren, huid, lever, darm, skeletspier, hart, vetweefsel, bloed) verzameld voor uitgebreide vervolg analyse waaronder genexpressie analyse, metabolomics, and histologie.

De reden om ook wildtype muizen mee te nemen in de proef is dat we voor elk voer een directe vergelijking willen kunnen maken tussen wildtype en Fiaf KO. Weliswaar zou het aanbieden van de verschillende voeren aan alleen de Fiaf Ko muizen voldoende zijn om te beoordelen welke dieetsamenstelling leidt tot ontwikkeling van ontstekingsverschijnselen, echter om het specifieke effect van het ontbreken van Fiaf te kunnen vaststellen is het includeren van wildtype muizen noodzakelijk. Temeer omdat we deze nieuwe proef willen benutten om verder inzicht te krijgen in de gevolgen van het ontbreken van Fiaf voor specifieke aspecten van de darmfunctie (met name immuniteit). Met de inzichten

die in de vorige proeven zijn opgedaan zijn nieuwe ideeën ontstaan voor verder onderzoek die verzameling van nieuw weefselmateriaal op specifieke tijdstippen vereisen. We hebben de mogelijkheid overwogen om de huidige dierproef als pilot in te richten, daarbij alleen gebruik makend van de Fiaf KO muizen. Deze pilot zou dan informatie geven over welk type voer aanleiding geeft tot ontsteking in Fiaf Ko muizen. In een vervolgprouf zouden de effecten van voeder die aanleiding geven tot ontsteking verder worden uitgezocht in een parallele dierproef in wildtype en Fiaf Ko muizen. De verwachting was echter dat deze strategie uiteindelijke zou leiden tot een hoger aantal te gebruiken dieren (dww. inclusief vervolgprouf).

Tot nu toe hebben we waargenomen dat de ontwikkeling van ontsteking optreedt in Fiaf KO op een voer dat 45 energieprocent vet bevat als palmolie. Dit voer fungeert dus als referentie. Om uit te zoeken wat het belang is van enerzijds het vetpercentage en anderzijds de vetsamenstelling hebben we uitgaande van dit voer telkens maar één parameter veranderd: ofwel hoeveelheid vet, ofwel vetsamenstelling. Voor de beantwoording van onze vraagstelling is het niet nodig de andere voeren ook in 25% vorm aan te bieden. Daarbij zou dit leiden tot een sterke stijging van het aantal te gebruiken dieren.

In eerdere proeven hebben we kunnen vaststellen dat het ontbreken van Fiaf gepaard gaat met een veranderde immuunfunctie in de darm. Teven zijn er aanwijzingen dat een voer rijk aan vet de samenstelling van de darmflora doet veranderen, zodanig dat sterker een beroep moet worden gedaan op het immuunsysteem in de darm. Onze hypothese is dat veranderingen in de darmflora als gevolg van hoog vet voer niet adequaat kunnen worden opgevangen in de Fiaf Ko muizen met als gevolg ontwikkeling van infectie. We vermoeden dat een rijke toestroom van endotoxinen van de darm naar de lever in de Fiaf Ko muizen op hoog vet voer de oorzaak is voor de extreme activatie van de acute fase respons in de lever zoals in eerdere proeven waargenomen. Om te onderzoeken of hiervan inderdaad sprake is willen we een algemene endotoxinen test doen (LAL Chromogenic endotoxin) op het bloed in de poortader. Verder zal aan het eind van de prouf de microflora van de darminhoud en van de feces worden geanalyseerd om het effect van de verschillende voeren op darmflora te kunnen onderzoeken.

6.b. Mate van ongerief:

wildtype NFD (normal fat) 10en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD palm oil 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD lard 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD safflower oil 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD medium chain TG 45en%	B. Gering/Matig
wildtype HFD palm oil 25en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD lard 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	B. Gering/Matig
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Aangezien de dieren zullen worden opgeofferd voordat klinische verschijnselen zich gaan openbaren zal het ongerief beperkt zijn.

Dieetinterventie: gering

Wekelijkse bloedafname via staart: gering/matig

Risico optreden klinische verschijnselen: gering/matig (mbv. serum amyloid waarden zullen we ontsteking monitoren en zonodig het beoogde eindpunt (8 weken) vervroegen).

Orbitapunctie en poortader punctieonder verdoving, plus opoffering: gering/matig

Cumulatief: gering/matig

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- wildtype NFD (normal fat) 10en% D. Is wel toegepast.
- wildtype HFD palm oil 45en% D. Is wel toegepast.
- wildtype HFD lard 45en% D. Is wel toegepast.
- wildtype HFD safflower oil 45en% D. Is wel toegepast.
- wildtype HFD medium chain TG 45en% D. Is wel toegepast.
- wildtype HFD palm oil 25en% D. Is wel toegepast.
- Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en% D. Is wel toegepast.
- Fiaf-KO HFD palm oil 45en% D. Is wel toegepast.
- Fiaf-KO HFD lard 45en% D. Is wel toegepast.
- Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% D. Is wel toegepast.
- Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% D. Is wel toegepast.
- Fiaf-KO HFD palm oil 25en% D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

- wildtype NFD (normal fat) 10en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- wildtype HFD palm oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- wildtype HFD lard 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- wildtype HFD safflower oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- wildtype HFD medium chain TG 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- wildtype HFD palm oil 25en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Fiaf-KO HFD palm oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Fiaf-KO HFD lard 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Fiaf-KO HFD palm oil 25en% A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de dieetinterventie te beperken tot maximaal 8 weken wordt de ontwikkeling van klinische kenmerken vermeden. Mocht een groep al in een eerder stadium sterk verhoogde serum amyloid waarden vertonen (gemiddeld boven 1000 ug/mL) dan zullen alle dieren vervolgens zo snel mogelijk opgeofferd worden voor verzameling weefsels etc.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- wildtype NFD (normal fat) 10en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- wildtype HFD palm oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- wildtype HFD lard 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- wildtype HFD safflower oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- wildtype HFD medium chain TG 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- wildtype HFD palm oil 25en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- Fiaf-KO HFD palm oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- Fiaf-KO HFD lard 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- Fiaf-KO HFD safflower oil 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en% Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.

proef.

Fiaf-KO HFD palm oil 25en% Het dier is gestorven of gedood ter beindiging van de proef.

Toelichting:

De dieren zullen aan het eind van de proef worden opgeofferd voor verzameling bloed en weefsels

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Omdat nog onvoldoende bekend is over de achtergrond van de effecten van Fiaf op darm en algemene ontsteking is het nog niet mogelijk te beoordelen welk in vitro systeem geschikt zou zijn als model om de effecten van Fiaf op ontsteking en immuunfunctie verder te onderzoeken. Door te proberen het mechanisme verder uit te diepen kan in de toekomst mogelijk gericht het effect van Fiaf op bepaalde cellen worden bestudeerd. We hebben overwogen om de wildtype muizen weg te laten aangezien deze op geen van de dieeten een ontsteking zullen ontwikkelen. Om echter binnen elk dieet een directe vergelijking tussen wildtype en Fiaf KO muizen mogelijk te maken hebben we er toch voor gekozen om voor elk dieet ook de wildtype muizen mee te nemen.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008104.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
wildtype NFD (normal fat) 10en%		1	01	1	9					01	4	1	2 1
wildtype HFD palm oil 45en%	1	01	1	9					01	4	1	2 1	
wildtype HFD lard 45en%	1	01	1	9					01	4	1	2 1	
wildtype HFD safflower oil 45en%	1	01	1	9					01	4	1	2 1	
wildtype HFD medium chain TG 45en%	1	01	1	9						01	4	1 2 1	
wildtype HFD palm oil 25en%	1	01	1	9					01	4	1	2 1	
Fiaf-KO NFD (normal fat) 10en%	2	01	1	9					01	4	1	2 1	
Fiaf-KO HFD palm oil 45en%	2	01	1	9					01	4	1	2 1	
Fiaf-KO HFD lard 45en%	2	01	1	9					01	4	1	2 1	
Fiaf-KO HFD safflower oil 45en%	2		<<< Error: Value could not be decoded: 0 >>> <<< Error: Merge field started but no ending code used >>><#Tpsubspec.Eerder> <#Tpsubspec.HoofdAantal>										
			<#Tpsubspec.bijztech(QTechNr)> <#Tpsubspec.anesthesie>										
			<#Tpsubspec.bestongc> <#Tpsubspec.ongerief> <#Tpsubspec.eindtoestand>										
Fiaf-KO HFD medium chain TG 45en%	2	01	1	9						01	4	1 2 1	
Fiaf-KO HFD palm oil 25en%	2	01	1	9					01	4	1	2 1	

Uw aanvraag 2008104.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de proef, maar heeft bij de opzet een aantal inhoudelijke vragen waarop ze een antwoord wil alvorens tot een definitieve afweging te komen:

De DEC verzoekt u bij 4.a. (Nadere aanduiding gebruikte dieren) het gebruik van de wildtypegroepen te beargumenteren, aangezien het de DEC niet duidelijk is, wat de toegevoegde waarde van deze groepen is. De DEC acht uw argumentatie bij 9. (alternatieven) niet overtuigend, mede gezien het feit, dat nog niet duidelijk is, of er wel verschillen tussen de diëten zullen worden waargenomen. Tevens verzoekt de DEC u te beargumenteren, waarom 25% reservedieren nodig zijn (als de kans op uitval zo groot is, is het ongerief dan wel goed geschat?).

Bovendien verzoekt de DEC u bij 6.a. (proefschema) de keuze voor de verschillende toegediende vetten te beargumenteren en in dit kader tevens de verschillende vetten te typeren. In dit verband verzoekt de DEC u ook aan te geven, waarom alleen voor palmolie een groep met 25% wordt gebruikt.

Daarnaast verzoekt de DEC u bij 6.a. aan te geven, welke endotoxinen zullen worden gemeten.

Bovendien verzoekt de DEC u aan te geven, waar u naar gaat kijken in de vervolganalyse, welke hypothese hieraan ten grondslag ligt.

Tevens verzoekt de DEC u bij 6.c. (bronnen van ongerief) het risico van het optreden van klinische effecten toe te voegen en het ongerief hiervan te schatten, aangezien niet uitgesloten is, dat deze (ontstekings)verschijnselen optreden.

Bovendien verzoekt de DEC u de wijze van bloedafname opnieuw te bezien. Zij verwijst hiervoor naar overleg, dat hierover plaatsvindt met de biotechnici en de proefdierdeskundige.

Tenslotte heeft de DEC nog een opmerking van redactionele aard.

Zij verzoekt u ofwel de term LFD te vervangen door NFD (normal fat) of duidelijk aan te geven dat het vetgehalte in LFD niet lager is dan normaal en geen invloed heeft op het welzijn van de proefdieren.

De antwoorden zullen door het klein comité worden besproken en afgehandeld.

Uw aanvraag 2008104.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten gering/ matige ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies verzoekt de DEC u toe te lichten, wat u met de volgende passage bedoelt, aangezien dat de DEC niet helemaal duidelijk is (3^e alinea van 6.a., proefschema):

"We hebben de mogelijkheid overwogen om de huidige dierproef als pilot in te richten, daarbij alleen gebruik makend van de Angptl4 KO muizen. De verwachting was echter dat het uiteindelijke aantal te gebruiken dieren (d.w.z. inclusief vervolgprouf) hoger uit zou vallen".

Uw antwoord zal door de secretaris van de DEC worden afgehandeld.

Uw aanvraag 2008104.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten gering/ matige ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC