



Afbeelding 1. Muis met knaaghoutje.

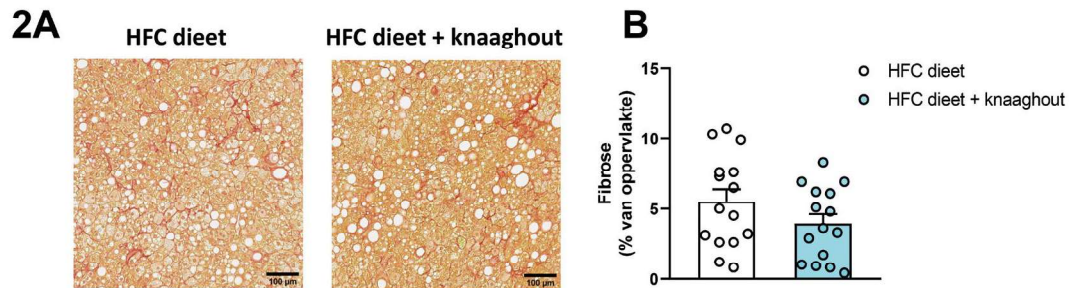
Knaaghoutjes in een dieet-geïnduceerd niet-alcoholisch steatohepatitis (NASH)-muismodel

Niet-alcoholische leververvetting en leverontsteking oftewel niet-alcoholische steatohepatitis (NASH) is één van de snelst groeiende leveraandoeningen. Helaas zijn er voor deze aandoening nog geen goedgekeurde medicijnen beschikbaar. Daarom worden er wereldwijd veel nieuwe NASH-therapieën ontwikkeld. Bij deze ontwikkeling wordt er vaak gebruik gemaakt van preklinische muismodellen die na het eten van een hoog-vet dieet NASH ontwikkelen. In deze studie hebben wij onderzocht of het toevoegen van een knaaghoutje als extra kooiverrijking (Afb. 1) invloed heeft op de dieet-geïnduceerde ontwikkeling van NASH in het muismodel.

Nicole Worms, Anita M. van den Hoek
Afdeling Metabolic Health Research, Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek (TNO)
Contact: nicole.worms@tno.nl

Materiaal en methoden

Alle dierenverzorging en experimentele procedures werden goedgekeurd door Instantie voor Dierenwelzijn van TNO (referentienummer TNO-362) en waren in overeenstemming met specificaties van de Europese Gemeenschap met betrekking tot het gebruik van proefdieren. Om onze vraagstelling te testen hebben wij APOE*3Leiden.CETP-muizen gebruikt, een muismodel met een meer humaan lipide-metabolisme en die bij gebruik van het juiste dieet gevoelig zijn om obesitas en NASH te ontwikkelen [1,3]. Mannelijke muizen werden op een leeftijd van 12-17 weken op een hoog-vet en -cholesterol dieet (High Fat Cholesterol of HFC-dieet; Cat. nr. D04102102i; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) gezet om NASH te induceren. Groep 1 (n=15) kreeg als kooiverrijking alleen nestmateriaal, groep 2 (n=15) kreeg naast nestmateriaal ook een Aspen wood knaaghoutje (Bio Services, Uden, Nederland) aangeboden. Bij bakken met vier of meer dieren werden twee knaaghoutjes aangeboden. Gedurende 25 weken werd het dieet wekelijks bijgevoerd en werden de knaaghoutjes indien nodig vervangen. Na 25 weken op dieet werden de muizen gewogen en werd na 4 uur vasten via een staartsnede bloed afgenomen en werd bloedglucose gemeten m.b.v. een glucosemeter (Freestyle Disectronic, Vianen, Nederland). In het plasma werden cholesterol en triglyceriden gemeten m.b.v. enzymatische assays (CHOD-PAP and GPO-PAP, respectievelijk; Roche Diagnostics, Almere, Nederland). Een dag na de bloedafname zijn de dieren ongevast getermineerd door geleidelijke CO₂-verstikking. Na de terminatie werd de lever er uitgenomen, gewogen en gefixeerd in formaline en in paraffine ingebed om de NASH-pathologie te bestuderen.



Afbeelding 2. Coupes van de lever met een Sirius Rood-kleuring (2A) en de mate van leverfibrose (2B).

Van deze lever werden 3 μm coupes gesneden en vervolgens gekleurd met een hematoxylin en eosine (H&E)-kleuring en een Sirius Rood-kleuring. NASH werd blind gescoord door een gecertificeerde patholoog volgens een scoringssysteem voor knaagdieren [4] wat gebaseerd is op een humaan NASH-scoringsysteem [5].

Hierbij werd in twee coupes de mate van macro- en microvesiculaire steatose als oppervlaktepercentage gemeten. Ook werd de leverinflammatie gescoord door het aantal inflammatoire aggregaten te tellen per microscoopveld bij een 100x vergroting (microscoopveld van 4,2 mm^2). Het gemiddelde van vijf velden in twee coupes werd vervolgens uitgedrukt als waarde per mm^2 . De leverfibrose werd gemeten in twee Sirius Rood-gekleurde coupes d.m.v. een computerbeeldanalyse van de hoeveelheid collageen (als oppervlaktepercentage).

	HFC-dieet	HFC-dieet + knaaghoutje
Metabole parameters		
Lichaamsgewicht (g)	47.2 \pm 1.7	46.5 \pm 1.0
Lever gewicht (g)	3.6 \pm 0.2	3.6 \pm 0.2
Voedselinname (g/muis/dag)	2.8 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1
Bloedglucose (mM)	6.5 \pm 0.2	6.8 \pm 0.3
Plasmacholesterol (mM)	24.7 \pm 2.4	19.1 \pm 2.1
Plasmatriglyceriden (mM)	10.6 \pm 1.4	8.2 \pm 1.3
Metabole parameters		
Macrovesiculaire steatose (% van oppervlakte)	23.5 \pm 2.2	25.1 \pm 1.8
Microvesiculaire steatose (% van oppervlakte)	34.1 \pm 3.5	39.8 \pm 2.0
Inflammatie (aantal inflammatoire aggregaten/ mm^2)	79.2 \pm 9.5	69.7 \pm 10.5
Fibrose (% van oppervlakte)	5.5 \pm 0.8	3.9 \pm 0.7

Tabel 1. Metabole parameters en leverhistologie na 25 weken HFC-dieet met en zonder knaaghoutje.

Resultaten en conclusie

Zoals te zien is in Tabel 1 had de toevoeging van een knaaghoutje geen effect op en de voedsel-inname, de gewichtstoename en de levergewichten. Ook zagen wij geen significante verschillen tussen de groepen op bloedglucose en plasma-cholesterol en triglyceriden concentraties. In Afbeelding 2A is van beide groepen een representatieve foto van een Sirius Rood-gekleurde levercoupe te zien. Na de histologische analyse van de lever bleek dat er geen significant verschil was tussen beide groepen op zowel de leververvetting (gemeten als macro- en micro-vesiculaire steatose) als leverinflammatie (Tabel 1). Ook de leverfibrose (Tabel 1 en Afb. 2B) was niet verschillend in beide groepen. Hieruit concluderen wij dat het toevoegen van een knaaghoutje in ons muismodel geen invloed heeft gehad op de dieet-geïnduceerde inductie van NASH en dus veilig gebruikt kan worden als kooiverrijking.

Bronnen

1. Hoek, van den, AM, van der Hoorn JWA, Maas AC, et al.; APOE*3 Leiden.CETP transgenic mice as model for pharmaceutical treatment of the metabolic syndrome. *Diabetes, obesity & metabolism* 16, 537–544, <https://doi.org/10.1111/dom.12252> (2014).
2. Liang W, Verschuren L, Mulder P, et al.; Salsalate attenuates diet induced non-alcoholic steatohepatitis in mice by decreasing lipogenic and inflammatory processes. *Br J Pharmacol* 172, 5293–5305. <https://doi.org/10.1111/bph.13315> (2015).
3. Hoek, van den, AM, Verschuren L, Caspers MPM, et al.; Beneficial effects of elafibranor on NASH in E3L.CETP mice and differences between mice and men. *Sci Rep.* 2021 Mar 3;11(1):5050. doi: 10.1038/s41598-021-83974-8.
4. Liang W, Menke AL, Driessen A, et al.; Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS ONE* 9, e115922.
5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115922> (2014).
6. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al.; Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321.
7. <https://doi.org/10.1002/hep.20701> (2005).