

Eiwitexcretie kan worden bepaald na kort verblijf in metabole kooi

Ilse Kion, Jürgen W. A. Sijbesma, Aren van Waarde

Afdeling Nucleaire Geneeskunde en Moleculaire Beeldvorming, Universitair Medisch Centrum Groningen. j.w.a.sijbesma@umcg.nl

Ilse Kion heeft met haar stage-onderzoek de aanmoedigingsprijs alternatieven voor dierproeven 2018 gewonnen. In dit artikel legt zij met haar begeleiders uit hoe een kleine verandering in proefopzet het ongerief voor de dieren kan verminderen.

Chronische nierinsufficiëntie duidt op een progressief verminderde nierfunctie. Verschillende ziekten zoals diabetes, hoge bloeddruk en hart- en vaatziekten kunnen nierschade veroorzaken waardoor functioneel nierweefsel verloren gaat. Door het verlies van functioneel nierweefsel wordt het resterende weefsel overbelast, wat tot verdere verslechtering van de nierfunctie leidt. Eén van de manieren om nierinsufficiëntie aan te tonen is door het meten van de eiwitexcretie (uitscheiding van eiwit in de urine). Vanwege defecte glomeruli kunnen eiwitten vanuit het plasma het glomerulaire filter passeren en in de urine terecht komen. Dit wordt ook wel proteïnurie genoemd. Naast de diagnostische waarde geeft de meting van eiwit in de urine ook een indicatie van de ontwikkeling van de nierziekte. Bovendien kan proteïnurie tot verdere nierinsufficiëntie leiden. Chronische nierinsufficiëntie en proteïnurie kunnen uiteindelijk volledig of bijna volledig functieverlies van de nieren veroorzaken. Het remmen of voorkomen van proteïnurie is om deze reden een belangrijke behandelstrategie om verder functieverlies van de nieren te voorkomen.

Metabole kooi

Om de mate van proteïnurie vast te stellen wordt de eiwitexcretie (uitscheiding) in urine bepaald. Dit gebeurt door over een periode van 24 uur (overgenomen van de humane geneeskunde) urine te verzamelen en hierin de hoeveelheid eiwit vast te stellen (concentratie eiwit \times geproduceerde volume urine = mg eiwit/24 uur). Om urine te kunnen opvangen worden de dieren in een metabole- of stofwisselingskooi geplaatst (een speciaal ontworpen kooi waar de >>

dieren op een rooster worden geplaatst en waarbij de urine en feces gescheiden van elkaar worden opgevangen). Het verblijf in een metabole kooi is voor het proefdier erg stressvol. De dieren worden gedurende lange tijd individueel geplaatst in een kooi met een roosterbodem en met beperkte bewegingsruimte. De stress die dit de dieren oplevert uit zich in weinig tot niet eten en drinken, gewichtsverlies, overmatig verlies van haren en het niet uiten van natuurlijk gedrag (ongeriefscore: licht of matig).

Vanwege de grote impact van het verblijf in een metabole kooi op het welzijn van het proefdier, zijn er de afgelopen jaren veel initiatieven geweest om het ongerief te verminderen. Denk hierbij aan het verwarmen van de metabole kooien of het gebruik van kooiverrijking. Voor zover bekend is er echter nooit gekeken of het mogelijk is om het verblijf van de dieren in de kooi te verkorten zonder de uitkomsten van de meting te beïnvloeden. Wij hebben gekeken of het mogelijk is om de mate van proteïnurie te bepalen indien dieren korter dan 24 uur in een metabole kooi worden geplaatst.

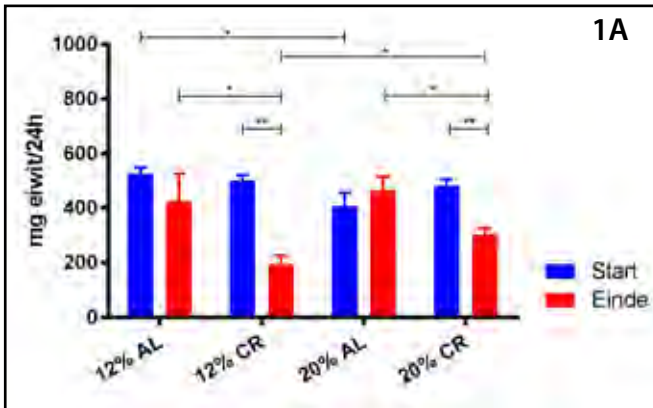
Materiaal en methode

Om de vraag te kunnen beantwoorden zijn in een onderzoeksproject naar het effect van een dieetbehandeling in ratten met nierinsufficiëntie op verschillende tijdstippen urinemonsters genomen.

In het kader van dit project werden na een acclimatisatieperiode 56 mannelijke Wistar ratten (Envigo) van 12 weken oud intraveneus geïnjecteerd met 2,1 mg Adriamycine® (doxorubicine)/kg lichaamsgewicht. Adriamycine is een kankermedicijn waarvan bekend is dat het in hoge dosering nierschade veroorzaakt. Exact zes weken na de injectie werd gekeken of de mate van proteïnurie voldoende was om de rest van het experiment te vervolgen (Start). Hiervoor werden de ratten individueel 24 uur in een metabole kooi geplaatst om de urine op te vangen. Tien en 24 uur na de start van de meting werd uit de opgevangen urine een monster genomen. De verzameling van de 10-uurs urine vond volledig plaats in de rustfase van de dieren.



»

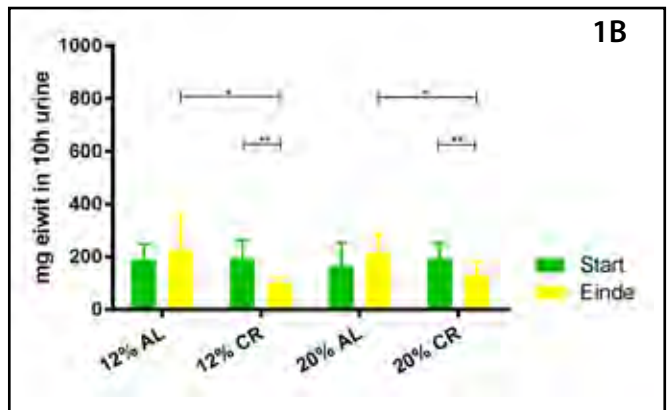


Afbeelding 1.

1A: Eiwitexcretie bepaald in 24-uurs urine per groep bij de start (blauw) en het einde (rood) van het experiment.

1B: Eiwitexcretie bepaald in 10-uurs urine per groep bij de start (groen) en het einde (geel) van het experiment.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$



Na de nulmeting werden de ratten random verdeeld over vier behandelgroepen:

1. 12% AL De ratten werden ad libitum gevoerd met een 12% eiwit dieet.
2. 12% CR De ratten werden onder restrictie gevoerd met een 12% eiwit dieet.
3. 20% AL De ratten werden ad libitum gevoerd met een 20% eiwit dieet.
4. 20% CR De ratten werden onder restrictie gevoerd met een 20% eiwit dieet.

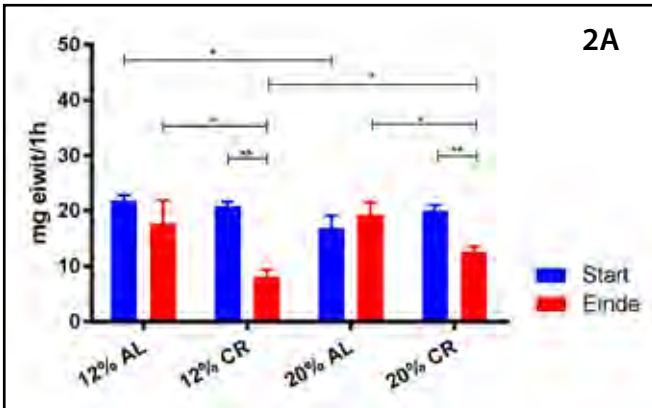
Gedurende 12 weken werden de ratten afzonderlijk behandeld. Na 12 weken volgde er een tweede meetmoment (Einde). De ratten werden wederom 24 uur in metabole kooi geplaatst waarna 10 en 24 uur na plaatsing een urinemonster werd verzameld en opgeslagen in de diepvriezer bij -20°C .

Aan het einde van het experiment zijn alle urinemonsters ontdooid, gereedgemaakt en aangeboden aan een diagnostisch onderzoekslaboratorium om de eiwitconcentratie te bepalen.

Eiwitexcretie is als volgt berekend: $\text{eiwitexcretie (mg/aantal uur)} = \text{eiwitconcentratie in urine} \times \text{het volume geproduceerde urine in het aantal uur}$.

Resultaten

Als we de eiwitexcretie over 24 uur (afb. 1A) vergelijken met de eiwitexcretie over 10 uur (afb. 1B), dan zien we duidelijk dat de excretie over 24 uur een factor 2 tot 3 hoger is. Dit is makkelijk te verklaren doordat de ratten meer tijd hebben gehad om eiwit uit te scheiden via de urine.

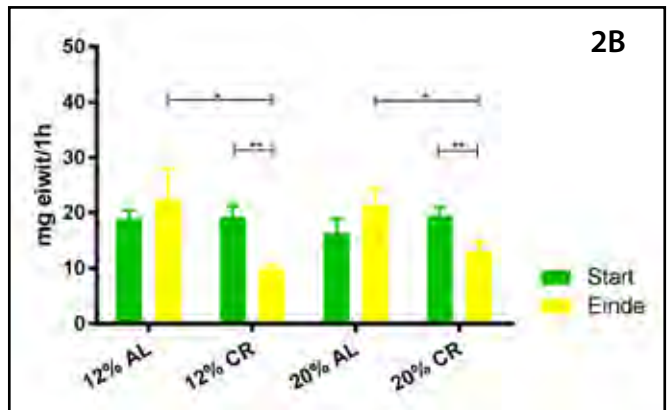


Afbeelding 2.

2A: De gemiddelde eiwitexcretie in urine per uur gemeten over een periode van 24 uur bij de start (blauw) en het einde (rood) van het experiment.

2B: De gemiddelde eiwitexcretie in urine per uur gemeten over een periode van 10 uur bij de start (groen) en het einde (geel) van het experiment.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$



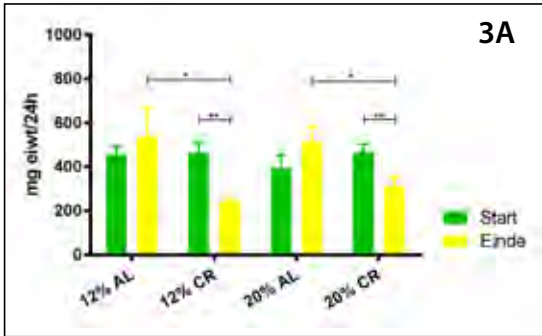
Afbeelding 2 laat zien dat er geen significante verschillen zijn tussen de gemiddelde eiwitexcretie per uur gemeten over 24 (afb. 2A) en 10 uur (afb. 2B). Naast het verschil tussen de gemiddelde eiwitexcretie per uur van de twee tijdstippen is er ook gekeken of de eiwit excretie bepaald over 10 uur dezelfde verschillen tussen de groepen aantoont als die bepaald over 24 uur. De aangetoonde verschillen zijn gelijk met uitzondering van het verschil tussen 12% AL en 20% AL groep bij de start van de studie en het verschil tussen 12% CR en 20% CR aan het einde van de studie. Tevens toont de grafiek aan dat er geen verschil is tussen een monster volledig verzameld in de rust fase en urine verzameld gelijkmatig verdeeld over de actieve fase en de rustfase.

Omdat in de literatuur de eiwitexcretie altijd uitgedrukt wordt als totaal eiwit/24 uur, hebben we gekeken of het mogelijk is om uit het 10-uurs monster de totale eiwitexcretie per 24 uur te bepalen. Er is gekozen voor twee benaderingen:

1. Benadering 1 gaat uit van de gemiddelde eiwitexcretie per uur verkregen uit 10-uurs urine maal 24 uur ($\text{mg eiwit}/24\text{h} = \text{mg eiwit}/\text{uur} * 24\text{ uur}$) (afb. 3A);
2. Benadering 2 gaat uit van de lineaire functie ontleend aan een regressieanalyse ($\text{mg eiwit}/24\text{h} = 225 + 1.38 * \text{mg eiwit}/10\text{h}$) (afb. 3B).

Er is gekeken of beide benaderingen verschillen met de eiwitexcretiedata verkregen uit de 24-uurs monsters (Afb. 3C). Verder is gekeken of beide benaderingen dezelfde verschillen laten zien tussen de groepen als de monsters verkregen uit de 24-uurs urine.

De berekende waarden verkregen uit beide benaderingen zijn niet significant verschillend met de werkelijk gemeten waarden verkregen uit de 24-uurs urine. Wel laat benadering 1 een >>



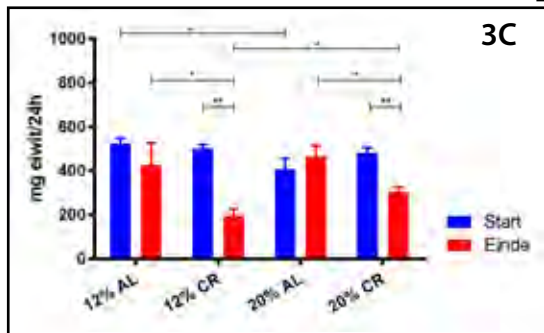
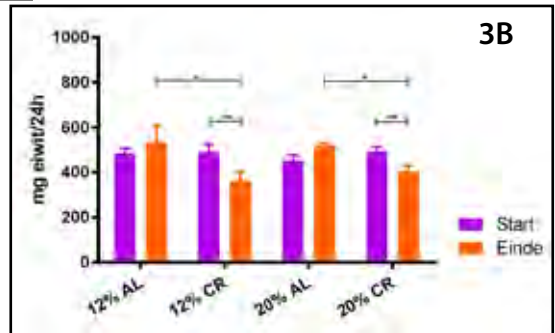
Afbeelding 3.

3A: De eiwitexcretie in urine verkregen uit berekening 1 ($\text{mg eiwit}/24\text{h} = \text{mg eiwit}/\text{uur} * 24 \text{ uur}$) bij de start (groen) en het einde (geel) van het experiment.

3B: De eiwitexcretie verkregen uit berekening 2 ($\text{mg eiwit}/24\text{h} = 225 + 1.38 * \text{mg eiwit}/10\text{h}$) bij de start (paars) en het einde (oranje) van het experiment.

3C: De eiwitexcretie verkregen uit 24-uurs urine (3C) bij de start (blauw) en het einde (rood) van het experiment.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$



iets groter spreiding zien dan benadering 2. Als we kijken per groep, methode en tijds punt zien we wel een verschil tussen methode 2 en de 24-uurs data in de 12% AL groep (Einde). Dit is mogelijk een toevalstreffer.

De twee methode laten ook dezelfde verschillen zien tussen de vier groepen en tijds punten met uitzondering van het verschil tussen 12% AL en 20% AL groep bij de start van de studie en het verschil tussen 12% CR en 20% CR aan het einde van de studie. Deze verschillen worden door de twee benaderingen mogelijk niet aangetoond door een grotere spreiding in de uitkomsten.

Discussie en Conclusie

De studie toont aan dat het verkorten van de tijdsduur in een metabole kooi voor het meten van de eiwitexcretie mogelijk is. De gemiddelde eiwitexcretie per uur toont aan dat er geen verschil zit tussen een meting volledig in de rustfase en een meting gelijkmatig verdeeld over de actieve fase en de rustfase. Het experiment heeft zich alleen gericht op eiwitexcretie i.v.m. onderzoek naar proteïnurie. Meer onderzoek is nodig om het effect van een verkorting van de meettijd te bepalen op andere nierfunctieparameters zoals creatinine-, ureum- en natriumconcentratie en creatinineklaring en wat de effecten zijn bij andere diersoorten of andere diermodellen.

«