

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM *

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-014

Ontvangen: 02-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-02-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³
01-294

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM						
--------------	-------	--	--	--	--	--	--

Deelproject	1.						
-------------	----	--	--	--	--	--	--

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

Budgetnummer	30981118N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

"Effect van warfarine-supplementatie op plaque progressie in apoE-/- muizen op een Westers dieet".

startdatum 01-03-2011

einddatum⁹ 01-03-2015Duur van de proef¹⁰: 18 weken

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegd- heid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art. 9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Overige uitvoerenden				Art.9	
4. overige uitvoerenden				Art.9	
5. Verantwoorde- lijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.12 ⁸	
6. PI				Art.9	

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	Exp	Exp					
Diersoort	01	01					
Stam	C57Bl6	C57Bl6					
Construct / mutatie ?	apoE-KO	apoE-KO					
Herkomst (leverancier) *	01	01					
Aantal	33	33					
Geslacht (M/V)	M	M					
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	8 weken	8 weken					
Doel van de proef *	31	31					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	02	02					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHI-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

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

Titel: "Effect van warfarine-supplementatie op plaque progressie in apoE^{-/-} muizen op een Westers dieet".

1. Doel van de proef.

Inleiding: Matrix gla protein (MGP) heeft zich bewezen als een van de belangrijkste (1) regulerende eiwitten omtrent vasculaire calcificatie. Vitamine K-afhankelijk matrix Gla-proteïne (MGP) is een proteïne dat calcium kan binden in zachte weefsels en osteogene differentiatie van gladde spiercellen kan inhiberen. Warfarine (vitamine K-antagonist) veroorzaakt bij ratten mediale verkalkingen doordat MGP onvoldoende gecarboxyleerd (=geactiveerd) en daarom onwerkzaam is. MGP wordt gesynthetiseerd in vascular smooth muscle cells (VSMC) en wordt daar ook geactiveerd waarbij vitamine K als co-factor wordt gebruikt. VSMC spelen een belangrijke rol in het ontstaan en progressie van atherosclerose. De vorming van een atherosclerotische plaque begint namelijk met het migreren van VSMCs van de media naar de intima. Recent onderzoek laat zien dat het gedrag van VSMC bij atherosclerose sterk gecorreleerd is met de expressie van MGP (2).

In deze dubbel knock-out muizen (apoE^{-/-} & MGP^{-/-}) ontstaan er significant minder en kleinere plaques in vergelijking met apoE^{-/-} muizen.

Verder is in onze groep waargenomen dat VSMC in vitro nodules vormen. Bij dit proces contraheren/migreren de cellen naar elkaar toe en vormen op deze manier een knoop van cellen. Dit proces wordt echter geremd door warfarine en gestimuleerd door MGP (3).

Deze waarneming in combinatie met de data van Yao *et al.*² heeft geleid tot de volgende hypothese:

Hypothese: Remmen van MGP activatie dmv vitamine K-antagonisten in de vroege fase van atherosclerose remt de plaque progressie.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

In dit toegepast onderzoek zullen de effecten bekeken worden van warfarine-supplementatie in apoE^{-/-} muizen op een Westers dieet (nieuw onderzoek). Uit DEC 2008-133 is gebleken dat geavanceerde plaques sneller verkalken onder invloed van vitamine-K antagonisten (VKA; warfarine). De experimenten gedaan in DEC 2008-133 laten de werking van VKAs zien na ontwikkeling van atherosclerose. In dit experiment wordt kennis vergaard over de werking van VKAs voor en tijdens het atherosclerose ontwikkeling.

Kennis van de onderliggende mechanismen betrokken bij gebruik van VKAs op de ontwikkeling van atherosclerose zal meer inzicht geven in het bestrijden van cardiovasculaire aandoeningen.

Extrapolatie naar de humane situatie zal niet gebeuren o.b.v. de resultaten van een experiment, maar in diverse stappen. De resultaten van deze studie zullen hieraan een belangrijke bijdrage leveren.

3. Alternatieven

Er bestaan geen alternatieven voor de voorgestelde dierenproef. Het proces van vitamine-K antagonisten op plaque ontwikkeling is dusdanig complex dat er geen geschikt alternatief *in vitro* model voorhanden is.

4. Ethische afweging

Cardiovasculair lijden is de belangrijkste doodsoorzaak van zowel vrouwen als mannen in Europa. Het is goed voor bijna de helft van de totale mortaliteit in Europa, met meer dan 4,35 miljoen overlijdens per jaar in de 52 lidstaten van de Europese regio van de Wereld Gezondheidsorganisatie (WGO) en meer dan 1,9 miljoen overlijdens per jaar in de Europese Unie. Cardiovasculair lijden is ook een belangrijke oorzaak van invaliditeit en daling van de levenskwaliteit. In verreweg de meeste gevallen gaat het om aderverkalking, dus het belang van ons onderzoek is groot.

De dieren krijgen smaak- en reukloos warfarine-verrijkt voedsel in de vorm van poeder en kunnen daar ad libitum van eten. Na afloop zal onder algehele verdoving bloed afgenomen worden via een hartpunctie en zullen de dieren ook worden opgeofferd. De aanvrager is van mening dat het ongerief in deze proef niet opweegt tegen het belang van nieuwe inzichten in de gezondheidsaspecten rond cardiovasculaire aandoeningen bij de mens.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Vasculaire calcificaties, ectopische afzettingen van calcium- en fosfaatmineraal ter hoogte van de coronairen en de aorta, zijn een belangrijke risicofactor voor cardiovasculaire en nieraandoeningen.

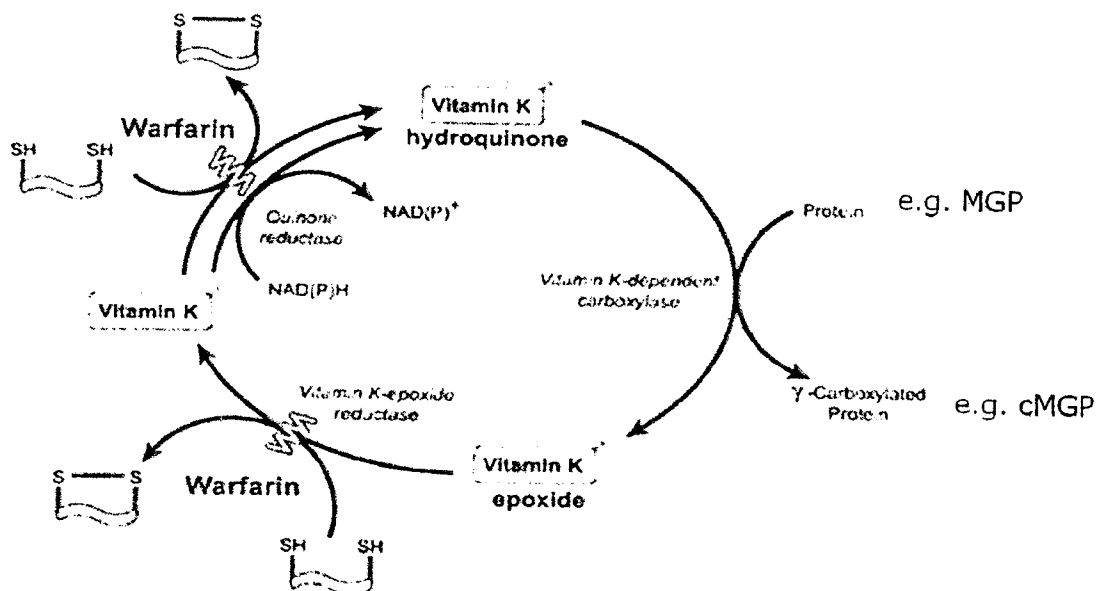
Vasculaire calcificatie wordt gereguleerd door het eiwit Matrix Gla Protein (MGP).

Transgene MGP^{-/-} muizen ontwikkelen zeer uitgebreide mediale calcificaties en sterven vroegtijdig door een ruptuur van de aorta in borst- of buikholte (7). De vitamine K-antagonist warfarine (Figuur 1, antistollingsmiddel) veroorzaakt bij ratten verkalkingen gelijkaardig aan de verkalkingen bij MGP-deficiënte muizen (1). MGP is een proteïne dat geproduceerd wordt door chondrocyten en vasculaire gladde spiercellen (8). Het kan calcium binden in zachte weefsels en osteogene differentiatie inhiberen. Warfarine veroorzaakt bij ratten mediale verkalkingen doordat MGP onvoldoende gecarboxyleerd en daarom onwerkzaam is (1). Niet-gecarboxyleerd MGP (ucMGP) wordt echter ook aangetroffen bij verkalkte atherosclerotische plaques in de intima van de vaatwand (7).

In ApoE-deficiëntie leidt een dieet met een verhoogd cholesterolniveau tot atherosclerotische plaques door een verstoorde opname van remnant lipoproteïnen uit de circulatie (5). Op een Westerse dieet hebben deze muizen duidelijk verhoogde serum cholesterol- en triglyceridenspiegels. Deze verhoging wordt versterkt als diëten worden gebruikt die zowel cholesterol als galzouten bevatten. Deze diëten worden veelvuldig gebruikt voor het induceren van atherosclerose (5, 6). Het geven van warfarine aan deze muizen na ontwikkeling van atherosclerose zorgt voor sterk verkalkte plaques via het hierboven beschreven mechanisme. Het blijft echter onbekent wat warfarine doet op de plaque progressie.

Yao *et al.* (2) heeft in zijn studie nogmaals aangetoond dat MGP een belangrijke factor is in calcificatie met behulp van Transgene apoE^{-/-} MGP^{-/-} en apoE^{-/-} MGP^{tg/tg} muizen. Yao laat ook zien dat weinig tot kleine atherosclerotische plaques ontwikkelen in apoE^{-/-} MGP^{-/-}. Dit zou een kunnen wijzen dat MGP expressie/activatie een belangrijke rol speelt bij plaque ontwikkeling.

Dit willen wij aantonen door middel van inactivatie van MGP (via warfarine) in apoE^{-/-} tijdens plaque ontwikkeling.



Figuur 1: De rol van warfarine in de vitamine K-cyclus.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Deze DEC aanvraag is beoordeeld en goedgekeurd door de PI van onze onderzoeksgroep (zie voorblad)

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species en gewenste stam: apoE knock-out muizen met C57BL6 als genetische achtergrond.

Transgeen, knock-out: ja, apoE-/-.

Motivatie keuze van de gebruikte diersoort: Zoals eerder vermeld zullen we gebruik maken van apoE-/- muizen op een Westers dieet. Het apoE-/- muis-model voor atherosclerose is een gevalideerd model om de pathogenese van aderverkalking te onderzoeken.

Herkomst: geregistreerd fokbedrijf.

Hergebruik: neen.

Uiteindelijke bestemming van het dier na de proef: opoffering onder volledige anesthesie.

7b. Sexe

Het geslacht van de muizen is van belang voor dit experiment. Voor atherosclerose proeven wordt gebruikt gemaakt van mannen omwille van de hormonale verschillen tussen beide geslachten op atherosclerose.

7c. Aantallen

Groepsgrootte is afhankelijk van o.a. een- of tweezijdig toetsen, σ (spreiding), δ (beoogd effect), gewenste power (0,80 tenzij dit niet volstaat).

Met de formule van L. Sachs: $n = 2(\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(\alpha/2 - z\pi)^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$

Dus $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding (σ) wordt geschat op 15% (gebaseerd op eerdere bevindingen: DEC2008-133).

Het beoogde effect (δ) wordt geschat op 20% (read-out parameter is plaque grootte).

Dit geeft; $n = 15,7 * (15/20)^2 = 15,7 * 0,75^2 = 8,83$

Uitval wordt geschat op 15% (data DEC 2008-133)

$(a - 0,15a) = 8,83$ of $0,85a = 8,83$ of $8,83/0,85 = a$

Dus $a = 10,38$

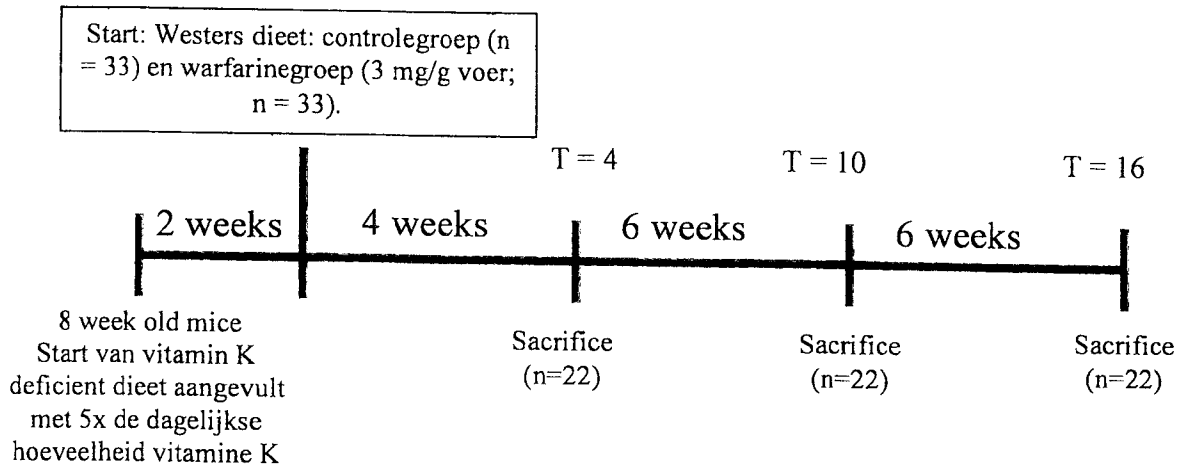
Aantal groepen = 2 (hoog vet dieet met of zonder warfarine)

Aantal dieren: 2 groepen x 3 tijdstippen plaque progressie x 11 = 66 dieren

7 Dierproef

8. Experiment

"Effect van warfarine-supplementatie op plaque progressie in apoE^{-/-} muizen op een Westers dieet".



Voorafgaand aan het onderzoek zullen alle apoE^{-/-} muizen gedurende 2 weken op een vitamine K arm dieet worden geplaatst. De muizen (n = 66) worden vervolgens willekeurig verdeeld worden over 2 testgroepen: controlegroep (n = 33) en warfarinegroep (3 mg/g voer; n = 33) en geplaatst worden onder een Westers dieet. De diëten worden door de VO bereid. Op week 4, 10 en 16 na de start van het westers dieet worden 22 muizen, 11 voor elke groep, opgeofferd voor analyse van de plaque progressie. Opoffering vindt plaats onder algehele verdoving waarbij de buik wordt opengemaakt en bloed (bepaling bloedwaarden; cholesterol, triglyceriden, calcium en fosfaat) verzameld worden via een hartpunctie. Vervolgens zullen de dieren opgeofferd worden. De aorta, coronairen en carotiden worden verwijderd voor histologie om de plaque progressie in kaart te brengen. Verder worden de hartjes, nieren, lever, longen, hersenen en milt verwijderd voor verdere *ex vivo* analyse.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De anesthesie (bij de opoffering van de dieren) vindt plaats in overleg met het CPV. Er zal gekozen worden voor een methode met minimaal ongemak voor de muizen.

9b. Pijnbestrijding n.v.t.

Nvt

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Humane eindpunten:

- De anesthesie (bij opofferen van de dieren) vindt plaats in overleg met het CPV. Er zal gekozen worden voor een methode met minimaal ongemak voor de muizen.
 - De dieren zullen eventueel voortijdig gedood worden als ze geen exploratief gedrag meer vertonen, niet meer eten of drinken of geen urine/feces meer produceren.
- Bij onduidelijkheden of mogelijke ziekte wordt contact opgenomen met art.14 functionaris. De euthanasie vindt d.m.v. pentobarbital natrium 200 mg/kg LG1/10 verdund IP of strikt IV.

10a. Ongerief

Eten van warfarine-verrijkt voer: gering ongerief (01).

Hartpunctie onder algehele anesthesie: gering/matig ongerief (02).

Opoffering onder algehele anesthesie: gering/matig ongerief (02).

10b. Welzijnsevaluatie

Literatuur betreffende het regime "warfarin-supplementatie" bij muizen ontbreekt. We hebben daarom de gekozen concentratie afgestemd op eerdere bevindingen (nog niet-gepubliceerde resultaten).

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden sociaal gehuisvest volgens de Code of Practice Welfare Monitoring in de experimentele ruimte van het CPV. Er zullen standaard kooien gebruikt worden. De muizen zullen gedurende hun verblijf in CPV op normale voeding geplaatst worden en verzorgd worden door medewerkers van het CPV. Bij calamiteiten kan de VO gewaarschuwd worden (

12. Deskundigheid

Ontwerpen en uitvoeren van een dierproef is wettelijk geregeld (WOD art. 9 en 12):

Bevoegdheid en bekwaamheid: Voor de verzorging en de anesthesie zal gebruik gemaakt worden van de deskundigheid van het CPV personeel.

Anesthesie en opofferen zal uitgevoerd worden door Overige uitvoerenden (Art. 9 en Art. 12) en VO (art. 9).

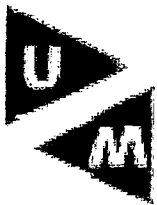
13. Standard Operation Procedures (SOP)

Opofferen en verwijderen van organen:

- Openen van de buik na algehele verdoving
- Doorknippen van het diafragma
- Afname van bloed via een hartpunctie
- Verwijderen van de aorta, coronairen en carotiden
- Verwijderen van de volgende organen: hart, nier, lever, longen, hersenen en milt.
- De VO is mogelijk aanwezig ter assistentie

Relevante literatuur

1. Price et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Sep;18(9):1400-7
2. Yao et al., *Circulation Res.* 2010, June 24, 107, 00-00
3. Zebboudj et al., *Journal of Cellular Biochemistry.* 2003; 90(4), 756-65.
4. Nakashima et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14:133-140
5. Eitzman et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jul;20(7):1831-4
6. Gijbels et al., *Atherosclerosis.* 1999 Mar;143(1):15-25
7. Luo et al., *Nature.* 1997 Mar 6;386(6620):78-81
8. Cranenburg et al., *Thromb Haemost.* 2007 Jul;98(1):120-5
9. Schurgers et al., *Thromb Haemost.* 2007 Dec;5(12):2503-11. Epub 2007 Sep 10



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: 06-48000000

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effect van warfarine-supplementatie op plaque progressie in apoE-/muizen op een Westers dieet*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Het GGO nummer is niet juist. De DEC verzoekt het juiste GGO nummer en de juiste GGO medewerker te vermelden op het voorblad.
- De aantallen op het voorblad stemmen niet overeen met de aantallen genoemd bij punt 7c. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.
- De DEC verzoekt de PI met naam op het voorblad te vermelden.
- Bij punt 8 merkt de DEC op dat de firma Hope Farms niet meer bestaat.

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 **2011-014**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



University Maastricht

Aan: _____ voorzitter
Secretariaat DEC-UM
Telefoon:

Maastricht, 2 februari 2011

Geachte leden van de DEC,

Bij deze brief is het verbeterde DEC protocol (2011-014) toegevoegd. Hierbij zijn de volgende punten verbeterd (en grijs gekleurd in het DEC protocol):

- Het GGO nummer is veranderd naar **01-294**
- Op het voorblad zijn de aantallen, voorheen 38 per groep, verandert naar 33 per groep. Nu komen de aantallen overeen met de aantallen genoemd onder 7c in het DEC protocol
- De PI staat nu vernoemd op het voorblad onder de naam van
- Het gedeelte over de bereiding van het dieet is gewijzigd. Het dieet zal worden bereid en aangeleverd door de VO zelf.

Met vriendelijke groet,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
08-02-2011

Project: *Effect van warfarine-supplementatie op plaque progressie in apoE-/- muizen op een Westers dieet.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

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

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

Projectnummer: 2011-014

Diersoort: muis

Aantal dieren: 66

Einddatum: 07-02-2015

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