

96

1

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie**DECNR: 2011-002****Ontvangen: 03-02-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
10-02-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

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.			X (TU/e)
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	----------

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

Budgetnummer 503570

Titel van het onderzoek:

De rol van celtensie voor het differentiëren van spiercellen in 3D kweken.

startdatum 06/02/2011

einddatum ⁹ 31/12/2011Duur van de proef¹⁰: 1 dag

	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	CPV-medewerkers			Art. 12 ⁸	
5.				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	exp						
Diersoort	01						
Stam	C57BL/6						
Construct / mutatie ?	Nee						
Herkomst (leverancier) *	01						
Aantal	23						
Geslacht	m/v						
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	6-8 weken						
Doel van de proef *	37						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	02						
Anesthesie *	01						
Pijnbestrijding *	01						
Mate ongerief *	01						
Toestand dier einde exp*	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: De rol van celtensie voor het differentiëren van spiercellen in 3D kweken.

1. Doel van de proef.

De totale hoeveelheid spierweefsel vormt het grootste metabole orgaan van het lichaam en heeft de grootste capaciteit om eiwitten op te slaan. Spierweefsel is dan ook de belangrijkste bron van eiwitopname uit voedsel in een groot deel van de wereld. Efficiënte en tevens diervriendelijke methodes om de alsmaar toenemende vraag naar vlees te ontwikkelen, zou middels tissue-engineeren mogelijk kunnen zijn. Daarnaast hebben mensen met spierziekten, zoals myotone dystrofie en verlies van spierweefsel als gevolg van letsel, te maken met een afname van functionaliteit en dus van verlies in kwaliteit van leven. Vervangingstherapieën met getissue-engineerd spierweefsel zouden hierbij een uitkomst kunnen vormen. Hierdoor is spier een interessant orgaan voor tissue engineers.

In het lichaam zijn adulte stamcellen aanwezig in spierweefsel: satellietcellen. Zelfs bij aanzienlijke defecten kunnen deze cellen het gehele spierweefsel regenereren, hoewel ze slechts in een klein aantal aanwezig zijn. Geactiveerde satellietcellen delen zich veelvuldig, waarna ze fuseren tot myotubes die uiteindelijk matureren tot volwaardige spiervezels. Deze celbron is op dit moment dan ook de meest veelbelovende kandidaat voor tissue engineering. Het proces van differentiatie en maturatie wordt gestuurd door chemische, dan wel fysische signalen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat mechanische stimulatie dit proces kan bevorderen. Naast mechanische stimulatie is ook de interactie met extracellulaire matrix eiwitten van belang bij de determinatie en differentiatie van stamcellen. Onze hypothese is dat het simuleren van natuurlijke omgevingsfactoren de maturatie richting volwassen spiervezels positief beïnvloed. Deze maturatie uit zich in grote, meerdere kernen bevattende spiervezels met bijbehorende dwarsstreping en genexpressie. Dit onderzoek maakt deel uit van een lopend onderzoek op de TU/e waar wordt gekeken naar de invloed van biofysische factoren op de differentiatie van spiercellen. Het doel van het huidige onderzoek is het bepalen van de essentiële rol die cel spanning in een 3dimensionele kweek speelt voor de differentiatie tot volwassen spiervezel.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

De huidige vraag naar vlees in de westerse wereld heeft als gevolg dat veel dieren een schrijnend leven leiden in de bio-industrie. Indien aan een deel van deze vraag kan worden voldaan door middel van artificieel, fabrieksmatig geproduceerd vlees, kunnen we veel leed voorkomen. De verwachting is, door dit fundamenteel onderzoek in muizen te doen, snel resultaat te kunnen boeken om te extrapoleren naar dieren die gebruikt worden voor vleesproductie, aangezien het spierregeneratie proces vergelijkbaar is.

Bovendien is het maken van spierweefsel voor vleesproductie en het maken van spierweefsel voor regeneratieve geneeskunde gebaseerd op dezelfde principes en zullen de resultaten uit dit onderzoek naar beide gebieden vertaald kunnen worden.

3. Alternatieven

Een geïmmortaliseerde cellijn (C2C12) is in eerdere studies gebruikt en ook vergeleken met de primaire cellen geïsoleerd uit de muizenspieren (). De primaire cellen zijn niet geheel vergelijkbaar met de cellijn en vertonen na differentiatie een volwassener cytoskelet dan de cellijn. Daarom zijn we van mening dat voor juiste beantwoording van onze vraagstelling het gebruik van de primaire, uit muizenspier geïsoleerde cellen, essentieel is. (Boonthekul et al, 2007). De resultaten die verkregen worden zijn aanvullend voor eerdere studies met deze cellen, waarbij is gekeken naar de effecten van substraat stijfheid op satellietcel proliferatie en differentiatie. Ook zijn alle antilichamen en PCR primers op muismateriaal reeds ontworpen en gevalideerd.

4. Ethische afweging

Door de bevolkingsgroei en het steeds rijker worden van de westerse wereld, neemt de vraag naar vlees toe. Indien aan een deel van deze vraag kan worden voldaan door middel van artificieel vlees, kan veel dierenleed voorkomen worden. Bovendien kan de kennis die nodig is voor het produceren van dit vlees ook worden toegepast om functioneel spierweefsel te tissue engineeren wat kan worden gebruikt voor transplantaties. Het ongerief voor de dieren is daarbij relatief laag, aangezien het weefsel afgenomen wordt na euthanasie van het dier en er geen verdere ingrepen gedaan worden.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Satellietcellen zijn adulte stamcellen die zich bevinden in spierweefsel tussen het sarcolemma en het basaal membraan. Hoewel er slechts een klein aantal van deze cellen aanwezig is in spierweefsel, zijn deze toch in staat de spier keer op keer te repareren (regenereren). Echter, wanneer deze cellen uit hun natuurlijke omgeving zijn gehaald en opgekweekt, is hun regeneratieve capaciteit te verwaarlozen wanneer ze worden geïnjecteerd in een beschadigde spier. Wanneer ze echter samen met de vezel, in hun natuurlijke positie en omgeving worden geïmplanteerd, vindt robuuste regeneratie plaats (Collins et al, 2005). Het is dus te verwachten dat er omgevingsfactoren zijn die essentieel zijn voor de regeneratiecapaciteit van satellietcellen. Deze omgevingsfactoren zijn onder andere extra cellulaire matrix eiwitten waar de cel via integrines aan hecht en sensorische/mechanische signalen mee uitwisselt. Door mechanotransductie zullen deze signalen uiteindelijk in de cel leiden tot genexpressie, wat op zijn beurt weer het lot van de gehele cel bepaalt. Zo is bekend dat mechanische stimulatie via laminine een positieve invloed op de differentiatie van C2C12 myoblasten heeft, terwijl mechanische stimulatie via fibronectine geen effect heeft (Grossi et al, 2007). De resultaten verkregen uit experimenten met C2C12 myoblasten kunnen echter significant verschillen van resultaten met primaire stamcellen of satellietcellen (Boontheekul et al, 2007). In recente studies is onderzocht wat de invloed is van 3D kweken en met name mechanische stimulatie op de differentiatie van deze cellen. Hierbij is ontdekt dat de 3D omgeving zorgt voor een snellere differentiatie dan een 2D omgeving, ondanks dat de stijfheid van het 3D weefsel lager is dan de stijfheid in 2D die nodig is voor optimale differentiatie (Boonen et al. J Biomech. 2010 en Boonen et al, J Tissue Eng Regen Med. 2010).

In dit onderzoek willen we het effect van mechanische stimuli op satellietcellen gehecht op verschillende eiwitten onderzoeken. De resultaten kunnen worden gebruikt voor optimalisatie van skeletspier tissue engineering en de ontwikkeling van een bioreactor ten behoeve hiervan.

Referenties

- Boontheekul, T., E. E. Hill, et al. (2007). "Regulating myoblast phenotype through controlled gel stiffness and degradation." *Tissue Eng* 13(7): 1431-42.
- Collins, C. A. and T. A. Partridge (2005). "Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell." *Cell Cycle* 4(10): 1338-41.
- Grossi, A., K. Yadav, et al. (2007). "Mechanical stimulation increases proliferation, differentiation and protein expression in culture: Stimulation effects are substrate dependent." *J Biomech.*
- Boonen, K.J.M., Langelaan M.L.P. et al. (2010). "Effects of a combined mechanical stimulation protocol: Value for skeletal muscle tissue engineering." *J Biomech.* May 28;43(8):1514-21.
- Boonen, K.J.M. van der Schaft D.W.J. et al (2010). Interaction between electrical stimulation, protein coating and matrix elasticity: a complex effect on muscle fibre maturation. *J Tissue Eng Regen Med.* Jul 5, online.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is een vervolg op het Vitro Meat samenwerkingsproject gesubsidiëerd door SenterNovem en als zodanig door SenterNovem wetenschappelijk beoordeeld. Dit specifieke DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Er wordt gebruik gemaakt van C57BL/6 muizen van 6-8 weken oud, aangezien deze dieren een normaal spierregeneratie proces hebben en de isolatie van satellietcellen uit deze dieren goed is uit te voeren.

De dieren komen uit de fok CPV/ gedragsexperimenten UM of bij Harlan NL. Ook is het mogelijk om dieren te hergebruiken uit andere experimenten.

Hergebruik: Het zijn terminale experimenten waarbij een zo groot mogelijke spiermassa verwijderd wordt. Het hartweefsel kan worden gebruikt voor isolatie van cardiomyocyten bestemd voor een ander lopend onderzoek. Andere organen zijn eventueel bruikbaar voor andere onderzoekers.

De muizen worden ge-euthanaseerd en de dode dieren worden verzameld in de vriezer van kamer , TU/e. De mogelijkheid om spieren van muizen te gebruiken die onder een ander DEC vallen is overwogen. De muizen die bij de projecten van de worden gebruikt zijn van verschillende stammen of GGO (ApoE-/-) en bovendien worden in de meeste muizen contrastmiddelen ingespoten. We weten niet in hoeverre dit interfereert met onze experimenten (het gebruik van een andere muisstam of contrastmiddel). Om enige interferentie uit te sluiten hebben we besloten om muizen specifiek voor dit experiment aan te vragen. Ook is overwogen om gebruik te maken van muizen , maar omdat de opbrengst al laag is wanneer de isolatie direct in plaats vindt, verdient dit niet onze voorkeur aangezien het mogelijk zou leiden tot een toename van het aantal dieren.

7b. Sexe

Voor dit experiment worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.

7c. Aantallen

Uit een pilot-experiment met restmateriaal is gebleken dat uit slechts 1 spier (de Tibialis Anterior) ongeveer 25.000 satellietcellen kunnen worden geïsoleerd met de gebruikte isolatiemethode. De verwachting is dat bij gebruik van meerdere spieren uit beide achterpoten van een muis de opbrengst ongeveer 400.000 satellietcellen is. Uit een voorgaand experiment is gebleken dat we de cellen 3 passages kunnen doorkweken wanneer we de cellen in zeer lage dichtheid kweken. Dit betekent dat we de cellen 3 keer kunnen verdubbelen (p_0 400,000, p_1 800,000, p_2 1,600,000, p_3 3,200,000). Per spier-construct hebben we 1,000,000 cellen nodig voor de cellen in 3D omgeving en voor de 2D experimenten worden 15.000 cellen gezaaid. Er worden situatie met aanhechtingpunten en zonder aanhechtingpunten gebruikt en met verschillende (2) remmers (+controle) voor cytoskeleteiwitten op verschillende niveaus. Op drie tijdstippen wordt er gekeken naar gen expressie en verschillende morfologische eigenschappen met behulp van immunofluorescentie, hiervoor zijn in totaal 4 samples per tijdstip nodig voor RNA analyse, whole-mount kleuring, mechanische test en coupes voor kleuringen. Er wordt 1 controle groep meegenomen waar geen rek op plaats vindt. Het totale experiment wordt 3 maal uitgevoerd om variatie te ondervangen. Het minimale effect dat betekenisvol wordt geacht bij de in vitro experimenten is een remming van minimal 70% (δ) van de differentiatie te meten op verschillende manieren, met een bijbehorende standaarddeviatie van 30% (σ). De $\alpha=0.05$ en de power $\pi=0.9$. De power is op 0.8 gezet omdat we geen heel grote variaties in metingen verwachten. Om de groepsgrootte te bepalen van de experimenten gebruiken we dan de formule van L. Sachs: $n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$, $2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 = F$. voor $\alpha=0.05$ en power $\pi= 90\%$ $F_{0.90} = 15.7$. $n = 15.7 * (\sigma/\delta)^2$, dus $n = 15.7*0.184 = 3$.

De benodigde cellen worden dan 3 (experimenten)*3 (condities)*2 (wel versus niet aangehecht)*4

(analyses) $\cdot (1 \cdot 10^6 + 15.000) / 8$ (voor het aantal verdubbelingen tijdens opgroeien) $= 9.2 \cdot 10^6$ cellen, wat betekent dat wanneer we 400.000 cellen isoleren per muis, we 23 muizen nodig hebben.

7 Dierproef

8. Experiment

23 Dieren van 6-8 weken oud worden in experiment genomen. De dieren komen naar en worden daar ge-euthanaseerd. Dit zal gefaseerd gebeuren zodat optimale experimentele omstandigheden in acht kunnen worden genomen. De dieren worden ge-euthanaseerd d.m.v. cervicale dislocatie. Vervolgens worden verschillende spieren uit de achterpoten genomen t.b.v. isolatie van satellietcellen. De experimenten zijn als volgt opgebouwd:

- Dieren worden ge-euthanaseerd d.m.v. cervicale dislocatie.
- Verschillende spieren worden uitgenomen uit de achterpoten.
- Satellietcellen worden geïsoleerd uit spiervezels en gezaaid in 3D constructen (hydrogel) of op 2D harde ondergrond of gel.
- De samples worden wel of niet behandeld met remmers van cytoskeletvorming (bijvoorbeeld ROCK) en vervolgens worden de cellen gefixeerd of gelyseerd ten behoeve van tests.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er wordt geen anesthesie toegepast maar een verantwoorde manier van euthanasie waarbij de dieren d.m.v. inhalatie 3-4% isoflo + med. lucht 0,4 l/m in slaap worden gebracht en door middel van cervicale dislocatie worden ge-euthanaseerd bij aanvang van de proef.

9b. Pijnbestrijding

Pijnbestrijding wordt niet toegepast aangezien de dieren bij aanvang van de proef ge-euthanaseerd worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Dieren worden bij aanvang van de proef (leeftijd muis 6-8 weken) ge-euthanaseerd d.m.v. cervicale dislocatie onder anesthesie. Er wordt geen ongerief verwacht daar het doden zonder voorafgaande handelingen betreft. Mochten er onverwacht dieren ziek worden, abnormaal gedrag vertonen of ongerief: zich uitend in oa onverzorgde vacht, 5-10% gewichtsverlies worden ze geëuthanaseerd.

10a. Ongerief

Alle muizen worden in groepsverband gehuisvest. De muizen worden op een leeftijd van 6-8- weken in experiment genomen. Dit wil zeggen dat de dieren ge-euthanaseerd worden d.m.v. cervicale dislocatie waarna verschillende spieren uitgenomen worden uit de achterpoten ten behoeve van de isolatie van satellietcellen. Het te verwachten ongerief is gering (01).

10b. Welzijnsevaluatie

Tijdens eerdere huisvesting van muizen is geconcludeerd dat het welzijn van de muizen naar behoren was.

Dieren worden tijdens hun verblijf op de TUE dagelijks door CPV-medewerker gecontroleerd op welzijn.

11. Verzorging en huisvesting

De verzorging en huisvesting tot 6-8 weken vindt plaats bij het

van de TU Eindhoven, totdat de dieren in experiment worden genomen.

Huisvesting vindt plaats conform de normen van de Centrale Proefdier Voorzieningen Maastricht. De dieren worden conventioneel (in groepen) gehuisvest en worden gevoerd met een standaardvoer.

Bij calamiteiten de hoofdonderzoeker waarschuwen . De artikel 14 functionaris zal op de hoogte worden gesteld.

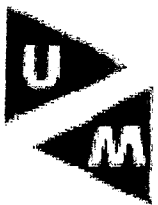
12. Deskundigheid

De hoofdaanvrager is artikel 9 functionaris en heeft veel ervaring met dierproeven en heeft al enkele keren spieren ge-oogst uit een getermineerd dier. De euthanasie zal plaatsvinden door een van de CPV functionarissen (art. 12) of VO (art. 9) in Eindhoven.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

SOP 1: Isolatie van satellietcellen uit spieren van de achterpoot

- De muis wordt onder anesthesie gebracht d.m.v. inhalatie 3-4% isoflo + med. Lucht 0,4 l/m.
- Vervolgens wordt de muis ge-euthanaseerd d.m.v. cervicale dislocatie.
- Verschillende spieren worden uitgeprepareerd uit de achterpoten en de satellietcellen worden vervolgens geïsoleerd en in kweek genomen.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan: TUE/
T.a.v.
Postbus 513
5600 MB Eindhoven

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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*De rol van celtensie voor differentiëren van spiercellen in 3D kweken*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag:

- Bij punt 7c mist de DEC de statistische onderbouwing voor de groepsgrootte van $N=3$ (graag baseren op een uitleesparameter).

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 , gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

From:
Sent: dinsdag 8 februari 2011 12:02
To: Dec Secretariaat
Subject: RE: Project 2011-002-w

Beste

De grootste spreiding verwacht ik op de meting van mechanische spanning op de weefsels en dat is 30%, daarop zijn de waardes gebaseerd. De kleuringen zullen meer een zwart-wit beeld geven of er wel of geen goed cytoskelet gevormd wordt en de PCR data zullen niet zo'n grote spreiding geven naar ik verwacht.

Met vriendelijke groeten,

Eindhoven University of Technology

5612 AZ Eindhoven
The Netherlands

From: Dec Secretariaat (, [mailto:..
Sent: dinsdag 8 februari 2011 11:20
To: !
Subject: FW: Project 2011-002-w

Dag

Ik heb de herziene versie van je aanvraag 2011-002 met de DEC besproken. Zij willen nog graag een bevestiging van het volgende:

- Kun je bevestigen dat de berekening betrekking heeft op de meetmethode(parameter) met de grootste spreiding(de genoemde 30%)?

Graag je reactie.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616-UNS 50-Box 48, 6200 MD Maastricht
T 043

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

From:
Sent: donderdag 3 februari 2011 17:38
To:

14-2-2011

Subject: RE: Project 2011-002-w

Beste Leden van de DEC,

Bij deze de aangepaste versie van DEC 2001-02. Zoals verzocht heb ik een verduidelijking in punt 7c aangebracht, waarbij het aantal experimenten dat in vitro nodig is wordt verklaard aan de hand van een statistische berekening. De wijziging is in de aanvraag met grijs gemarkeerd.

Met vriendelijke groeten,

Eindhoven University of Technology

5612 AZ Eindhoven
The Netherlands

From:

Sent: woensdag 2 februari 2011 12:03

To:

Subject: Project 2011-002-w

Geachte onderzoeker,

Uw projectaanvraag is in de DEC-UM – vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De uitslag treft u aan in bijgaand attachment.

Voortaan zult u uit efficiency overweging geen schriftelijke bevestiging meer ontvangen per post wanneer het een wijzigingsbrief betreft.

De DEC verzoekt U in een brief de vragen van de DEC te beantwoorden en de wijzigingen in het protocol duidelijk grijs te markeren, zodat het bij het kopiëren ook zichtbaar is.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616-UNS 50-Box 48, 6200 MD Maastricht

T 043

E-mail: secretaris@dec-um.nl

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

14-2-2011

Aan: TUE/
T.a.v.
Postbus 513
5600 MB Eindhoven

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
14-02-2011

Project: *De rol van celtensie voor differentiëren van spiercellen in 3D kweken.*

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**.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-002
Diersoort: muis
Aantal dieren: 23
Einddatum: 10-02-2015

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