

Verantwoording

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-133

Ontvangen: 27-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
31-10-2011	Nieuw

VROM/GGONR³

GGO 01-036

LNV/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.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

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

Budgetnummer 31961857B

Titel van het onderzoek: IgM antilichamen en cyclodextrine; mogelijke behandelingen voor NASH

startdatum December 2011

einddatum ⁹ November 2015Duur van de proef¹⁰: 23 weken

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				il Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.12	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. PI					

Diergroep	Exp1	Exp2	Exp3	Exp3 Ctrl donoren	Exp3 Exp donoren	
ctrl/exp/sham	Exp	Exp	Acceptor/Exp	Sham/donor	Exp/donor	
Diersoort	muis	muis	muis	muis	muis	
Stam	C57/bl6	C57/Bl6	C57/bl6	C57/bl6	C57/bl6	
Construct / mutatie ?	LDLr-/-	LDLr-/-	LDLr-/-	-	CD36-SRA-/-	
Herkomst (leverancier) *	01/04	01/04	01/04	01/04	01	
Aantal	44	66	104	13	13	
Geslacht	Vrouw	Vrouw	Vrouw	Man/Vrouw	Man/Vrouw	
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	
Leeftijd/gewicht	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	
Bijzondere technieken *	01	01	01	02	02	
Anesthesie *	01	01	01	01	01	
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01	
Mate ongerief *	04	02	04	01	01	
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	

* VHI-coderingen zie bijlage

93

Titel: IgM antilichamen en cyclodextrine; mogelijke behandelingen voor NASH.

1. Doel van de proef.

Achtergrond:

De huidige "obesitas epidemie" heeft tot gevolg dat het aantal mensen met een vette lever enorm toegenomen is. Een deel van deze mensen zal hierdoor leverontsteking ontwikkelen (Non alcoholic hepatic steatosis, NASH). Omdat de vette lever en de ontstoken vette lever niet in de kliniek worden opgemerkt, zijn we in de regel te laat met de diagnose, die in het algemeen pas wordt gesteld wanneer de lever ernstig beschadigd is. Om deze reden is er ook geen specifieke therapie voorhanden. Hoofdzakelijk speelt de ontsteking zich af in de lever-macrofagen (Kupffer cellen). Eigen onderzoek in hyperlipidemische LDLr-/- muizen heeft laten zien dat leverontsteking, ontstaat wanneer de Kupffer cellen worden geactiveerd door cholesterolrijke voeding. Vooral vrouwtjes reageren beter op dit cholesterolrijk dieet dan mannetjes, wat blijkt uit hogere cholesterolwaarden in het bloed zelfs naarmate ze ouder worden. Dit in tegenstelling tot de mannetjes waarbij de cholesterolwaarden juist afnemen over tijd (Van Vlijmen et al. JCI 1996). Bovendien hebben we aangetoond dat opname van gemodificeerd cholesterol door scavenger receptoren van de Kupffer cellen een cruciale rol kan spelen bij het ontstaan van leverontsteking. Ons eigen onderzoek heeft uitgewezen dat preventieve immunisatie (actieve immunisatie) waarbij voornamelijk geoxideerd cholesterol verhinderd wordt van opname door scavenger receptoren, leidt tot een afname van leverontsteking. Met deze studie gaan we onderzoeken of leverontsteking vermindert door direct IgM antilichamen toe te dienen (passieve immunisatie) ná inductie van NASH en welke onderliggende mechanismen hierbij een belangrijke rol spelen. De algemene oorzaak voor het ontwikkelen van leverontsteking is een verstoord cholesterol metabolisme voornamelijk in de lever. Cyclodextrines zijn natuurlijke producten die gevormd worden bij digestie van cellulose. Eerdere onderzoeken hebben aangetoond dat cyclodextrines in staat zijn cholesterol homeostase te reguleren. Naast IgM antilichamen, zouden dus ook cyclodextrines een mogelijke behandeling voor NASH kunnen zijn.

Doelstelling:

IgM antilichamen, mede als het toedienen van cyclodextrine, zal leiden tot een afname van leverontsteking. Dit biedt nieuwe mogelijkheden voor de diagnostiek en therapie voor NASH. Bovendien gaan we het effect van IgM immunisatie met betrekking tot cholesterol opname onderzoeken.

Methoden:

Dit project richt zich op de hoofdvraag of passieve immunisatie en ook cyclodextrines leverontsteking doet afnemen. Voor ons project gebruiken we een muismodel dat een verhoogde plasma cholesterol spiegel heeft na een hoog vet dieet, namelijk het hyperlipidemische model LDLr-/-. Deze muizen ontwikkelen (mits op een hoog vet dieet) over een verloop van tijd lever steatose, lever inflammatie als mede lever fibrose vergelijkbaar met een humane NASH patient. Via een beenmergtransplantatie kunnen we alle witte bloedcellen en daarmee ook de Kupffer cellen in dit model vervangen door cellen die een genetische verandering hebben in de cholesterol huishouding. Op deze manier kunnen we kijken naar het werkingsmechanisme van passieve immunisatie en de bijdrage aan het behandelen van NASH.

Verwachte resultaten:

Met dit muismodel gaan wij de precieze oorzaak van de leverontsteking op moleculaire niveau in kaart brengen en nieuwe aanknopingspunten definiëren voor diagnostiek en therapie van NASH.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Metabole verstoringen (waaronder NASH en diabetes), maar ook hart-en vaatziekten zijn levensbedreigende aandoeningen in onze Westerse samenleving. De incidentie stijgt in de loop der jaren. Tot op heden heeft men het mechanisme achter schuimcelvorming (met vet geladen macrofagen) nog niet ontrafeld. Aangezien deze schuimcellen een belangrijke rol spelen in het zieke proces van zowel atherosclerose als NASH, is het noodzakelijk om dit mechanisme te ontrafelen, om deze schuimcellen te bestrijden en dus ook NASH.

3. Alternatieven

Het lipidemetabolisme is een zeer complex gegeven met de lever als centraal orgaan. Ook de samenstelling van het lipoproteïneprofiel in de bloedstroom speelt een grote rol, net als hydrolyse, opname en afgave van vetten in de perifere organen. Deze processen worden ook nog beïnvloed door individuele cellen uit de circulatie. Dit systemische mechanisme is onmogelijk na te bootsen in *in vitro* systemen.

4. Ethische afweging

De exacte etiologie van NASH is tot op heden nog niet bekend. In de huidige samenleving zien we echter een stijging van het aantal gevallen. De prevalentie zal in de toekomst enkel nog stijgen en het is daarom van groot belang om de risicofactoren te ontcijferen om zo tot mogelijke behandelingen te kunnen komen. Het is helaas niet mogelijk om de proeven zonder genetische gemodificeerde proefdiermodellen te doen (zie punt 5). Hiervoor worden hyperlipidemische muizen gebruikt die een probleem hebben met de lipidenhuishouding. Bovendien is het gebruik van deze genetisch gemodificeerde muizen noodzakelijk, aangezien gewone muismodellen geen systemische inflammatie ontwikkelen na vetrijke voeding, wat dus geen goede reflectie is naar de menselijke wereld toe. Ondanks de onmogelijkheid van alternatieven wordt zo veel mogelijk getracht het aantal dieren zo klein mogelijk te houden (door statistische onderbouwing) en het lijden te beperken. Het gebruik van deze dieren zal een bijdrage betekenen voor mogelijke therapieën voor NASH.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De hoge cholesterol waarden in het bloed zijn verantwoordelijk voor de opname van cholesterol in de Kupffer cellen, waardoor deze cellen gaan lijken op de schuimcellen (= macrofagen gevuld met vet). Dit cholesterol kan niet zomaar de macrofaag binnentreden, maar moet eerst gemodificeerd worden (geoxideerd of geacetyleerd), vooraleer het wordt opgenomen door scavenger receptoren op de macrofaag. Eens de Kupffer cel geactiveerd is, zal het verder leiden tot de inflammatoire processen die zich afspelen in de lever.

Om de rol van deze schuimachtige Kupffer cellen in leverontsteking te bestuderen, hebben we al eerder een beenmergtransplantatie uitgevoerd met donor beenmerg van muizen die de 2 belangrijkste scavenger receptoren (CD36 en SR-A) niet bezitten. Als acceptormuizen hebben we de hyperlipidemische LDL receptor knock-out muizen gebruikt (DEC2006-177). De resultaten van deze studie hebben aangetoond dat wanneer deze 2 scavenger receptoren, die verantwoordelijk zijn voor het opnemen van gemodificeerd cholesterol, niet aanwezig zijn op de beenmergcellen van hyperlipidemische muizen, leverinflammatie ook verminderd is.

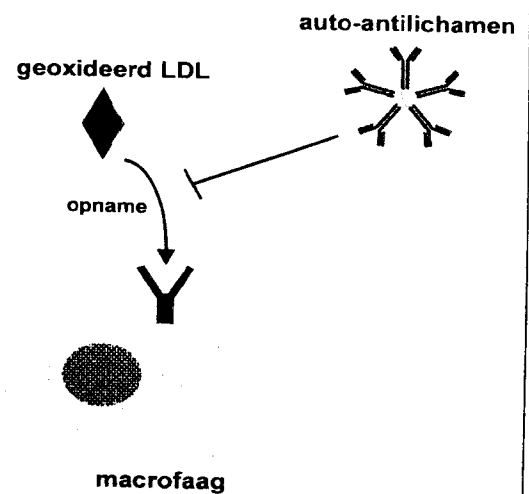
Experiment 1: Voorgaande studies laten zien dat het epitoom van geoxideerd cholesterol (oxLDL), phosphorylcholine (PC), de eigenschap heeft om specifieke IgM auto-antilichamen, **anti-PC antilichamen**, op te wekken. Opvallend is dat de capsulaire wand van *Streptococcus pneumoniae* dezelfde epitoom, phosphorylcholine, bevat en dus ook dezelfde auto-antilichamen opwekt. Binder et al toonde aan dat, na actieve immunisatie met geïnactiveerde *Streptococcus pneumoniae*, een verhoogd aantal anti-PC antilichamen in het plasma aanwezig waren en een verbetering van atherosclerose plaatsvond in LDL receptor knock-out muizen na een hoog vet dieet (Binder et al, Nature Medicine 2003). Atherosclerose en NASH hebben eenzelfde pathologische achtergrond, namelijk, opname van geoxideerd cholesterol door macrofagen wat leidt tot schuimcelvorming.

Eigen onderzoek geeft een vergelijkend resultaat weer, dat wanneer we LDL receptor knock-out muizen voorafgaand aan een hoog vet dieet, preventief geïnactiveerde pneumococci toedienen, serum anti-PC antilichamen zijn verhoogd en leverontsteking sterk is gereduceerd. In overeenkomst met deze bevindingen, zijn er verlaagde antilichaam titers in NASH patiënten vastgesteld, vergeleken met patiënten met een normale lever of lever steatosis alleen. Dit suggereert dat anti-PC antilichamen de herkenning remt van oxLDL door macrofaag scavenger receptoren. Hierdoor wordt opname en afbraak van oxLDL door macrofagen verhinderd met als gevolg een vermindering van schuimachtige macrofagen (zie Figuur 1).

We gaan met dit onderzoek, in plaats van het toedienen van geïnactiveerde pneumococci waarna een immuun respons optreedt (actieve immunisatie), voor het eerst rechtstreeks de anti-PC antilichamen toedienen (passieve immunisatie). **Hierbij stellen we de hypothese dat passieve immunisatie kan worden gebruikt als therapie voor het verminderen van leverontsteking in LDLr-/- muizen.**

Experiment 2:

Cyclodextrines zijn natuurlijke producten die worden gevormd tijdens de bacteriële afbraak van cellulose. Deze kegelvormige moleculen zijn zeer efficiënt in het stimuleren van cholesterol efflux uit verschillende cellen *in vitro*. De structuur van cyclodextrines is uitermate geschikt om het hydrofobe cholesterol te binden en te transporteren. Cyclodextrines beschikken namelijk over een hydrofobe



Figuur 1

holte, waarin cholesterol wordt ingesloten, en tevens over een hydrofiele buitenkant. Deze eigenschap van cyclodextrines maakt het mogelijk om cholesterol te transporteren tussen verschillende celmembranen (Christian AE et al. Journal of Lipid Research 1997). Dit maakt cyclodextrines geschikte kandidaten om het cholesterol metabolisme, wat verstoord is in de lever bij NASH, te verbeteren.

Eerder onderzoek toonde aan dat gedurende een dieet van 14 weken met toevoeging van cyclodextrines in LDLr^{-/-} muizen, plasma lipiden- en vetzuurwaarden sterk waren verbeterd. (Wagner EM et al. Metabolism 2008). Desondanks is er nog nooit eerder gekeken naar het effect van cyclodextrines met betrekking tot NASH.

Onze hypothese bij dit experiment zal zijn dat toediening van cyclodextrines in LDLr^{-/-} muizen op hoog vet dieet leverontsteking zal doen reduceren.

Experiment 3: OxLDL opname door macrofagen is een essentiële stap voor het ontwikkelen van leverontsteking. Daarom focust ons derde doel zich op de macrofaag scavenger receptoren CD36 en SR-A, de receptoren die verantwoordelijk zijn voor het opnemen van oxLDL. Hierbij gaan we de vraag beantwoorden of het effect van CD36 en SR-A op leverontsteking voornamelijk veroorzaakt wordt door oxLDL opname.

We verwachten dat uitschakeling van CD36 en SR-A, in combinatie met passieve immunisatie, leverontsteking verder doet reduceren in LDLr^{-/-} muizen op hoog vet dieet.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC-protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI (zie voorblad). Een project met gelijkaardige experimentele set-up is momenteel ingediend bij de Maag Lever Darm Stichting (MLDS) en is ook beschreven in een NWO Vidi proposal. Ook is de set-up intern beoordeeld door NUTRIM.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Alle gebruikte diermodellen zijn muizen. De stam die gebruikt zal worden (als acceptorgroep) is de LDLR knock-out muis (Fok UM/Jacksons's Laboratory (via Charles River)). De donorgroep CD36-SRA^{-/-} muizen zijn afkomstig van Fok UM. Aangezien de CD36-SRA^{-/-} fok een homozygote fok betreft, zullen de wildtype C57/Bl6 muizen afkomstig zijn van Jackson's Laboratory (via Charles River). Na de proef worden de dieren opgeofferd en organen worden geïsoleerd.

7b. Sexe

In de uit te voeren experimenten zullen uitsluitend vrouwtjes gebruikt worden, omdat uit eerder onderzoek gebleken is dat hyperlipidemische vrouwtjes beter op een hoog-vet dieet reageren. Zij krijgen een hoger cholesterolniveau in het bloed dan de mannetjes. Bovendien blijft het niveau constanter als het dier ouder wordt. Bij mannetjes neemt het niveau af naarmate ze ouder worden (Van Vlijmen et al. JCI 1996).

Voor experiment 3, waarbij beenmerg wordt getransplanteerd, kunnen de donormuizen zowel mannetjes als vrouwtjes zijn (geen voorkeur).

7c. Aantallen

Experiment 1: Passieve immunisatie met anti-PC antilichamen na inductie van NASH in Ldlr^{-/-} muizen

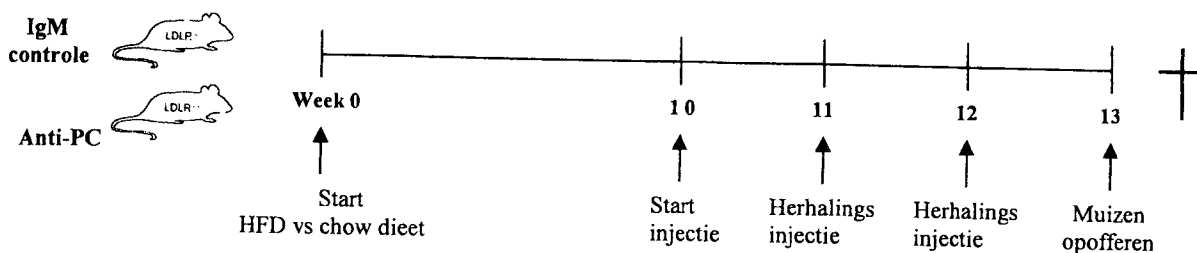
Onze inschatting is dat minimaal een effect op vlak van leverontsteking (bepaald dmv histologie voor infiltrerende macrofagen, neutrofielen, T-cellen; en genexpressie voor de markers TNF, IL6, MCP1, IL1b) zichtbaar moet zijn van meer dan 25%. Variatie is bepaald aan de hand van eerdere experimenten waarin een reeks parameters bepaald is, die laten zien dat de muizen 20% in deze parameters variëren. Met deze gegevens komt het aantal dieren per groep uit op (berekening volgens Sachs): $\sigma = 20$, $\delta = 25$ met $F = 15,7$; $n = 10,05$. Rekening houdend met een eventuele uitval van 5 % komen we uit op 11 dieren per groep.

Groep 1:

Immunisatie van **LDLr^{-/-} muizen** zal gebeuren **na** aanvang van het chow of hoog vet dieet (HFD). Na de eerste injectie in week 10 volgen nog 2 herhalingsinjecties. Er zal één groep zijn die alleen **IgM isotype controle** injecties ontvangt ($n = 11$) of **anti-PC** ($n = 11$). Gedurende de **gehele periode van 13 weken** worden de LDLr^{-/-} muizen op een chow of hoog vet dieet gezet.

In totaal zijn er 44 LDLr^{-/-} muizen nodig voor dit experiment:

Berekening: 2 injectiegroepen van elk $n = 11$ en 2 dieetgroepen (HFD vs chow). In totaal $11 \times 2 \times 2 = 44$ LDLr^{-/-} muizen.



TOTAAL: 44 Ldlr^{-/-} muizen

Experiment 2: Cyclodextrine als therapeutisch middel voor NASH

Onze inschatting is dat minimaal een effect op vlak van leverontsteking (bepaald dmv histologie voor infiltrerende macrofagen, neutrofielen, T-cellen; en genexpressie voor de markers TNF, IL6, MCP1, IL1b) zichtbaar moet zijn van meer dan 25%. Variatie is bepaald aan de hand van eerdere experimenten waarin een reeks parameters bepaald is, die laten zien dat de muizen 20% in deze parameters variëren. Met deze gegevens komt het aantal dieren per groep uit op (berekening volgens Sachs): $\sigma = 20$, $\delta = 25$ met $F = 15,7$; $n = 10,05$. Rekening houdend met een eventuele uitval van 5 % komen we uit op 11 dieren per groep.

Groep 2: Cyclodextrine preventief en ter behandeling

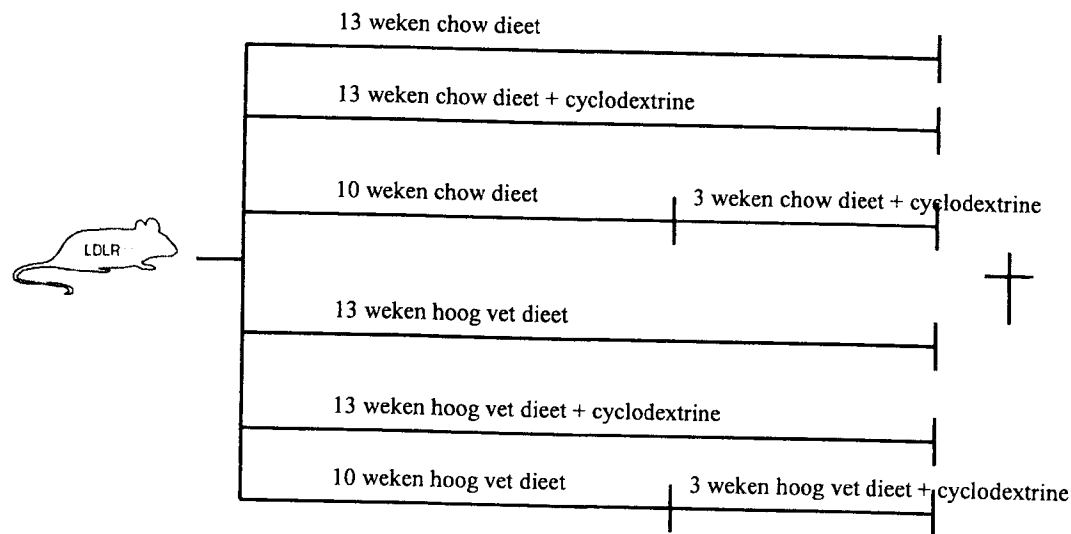
De behandeling van **LDLr^{-/-} muizen** zal gebeuren **voor en na** aanvang van het chow of hoog vet dieet. Ter controle gebruiken we 2 groepen van $n = 11$. De ene groep LDLr^{-/-} muizen krijgt over de gehele periode van 13 weken een hoog vet dieet, de andere groep een chow dieet.

Ter preventie gebruiken we ook weer 2 groepen van ieder $n = 11$. De ene groep LDLr^{-/-} muizen krijgt gedurende **de gehele periode van 13 weken een chow dieet met cyclodextrine**, de andere groep een **hoog vet dieet met cyclodextrine**.

Omdat cyclodextrine niet alleen kan dienen ter preventie, zal het cyclodextrine supplement ook worden toegevoegd aan het dieet ter behandeling. Hierbij gebruiken we ook weer 2 groepen van elk $n = 11$. De ene groep zal gedurende **de eerste 10 weken** een chow dieet krijgen zonder cyclodextrine, de andere groep een hoog vet zonder cyclodextrine. Beiden groepen zullen in de **laatste opeenvolgende 3 weken** cyclodextrine toegevoegd krijgen aan hun dieet.

In totaal zijn er 66 LDLr^{-/-} muizen nodig voor dit experiment:

Berekening: 6 dieetgroepen van elk n = 11. In totaal 6 x 11 = 66 LDLr^{-/-} muizen.



TOTAAL groep 2:

66 Ldlr^{-/-} muizen

Experiment 3: Beenmergtransplantatie dieren met WT en CD36-SRA^{-/-} donoren

Onze inschatting is dat minimaal een effect zichtbaar moet zijn van meer dan 25%. Variatie is bepaald aan de hand van eerdere experimenten waarin een reeks parameters bepaald is, die laten zien dat de muizen 20% in deze parameters variëren. Met deze gegevens komt het aantal dieren per groep uit op (berekening volgens Sachs): $\sigma = 20$, $\delta = 25$ met $F = 15,7$; $n = 10,05$. Rekening houdend met een eventuele uitval van 20 % (zoals gezien in eerdere experimenten binnen de groep) door de bestraling en de transplantatie zijn er dus in totaal 13 dieren noodzakelijk per groep.

Groep 3:

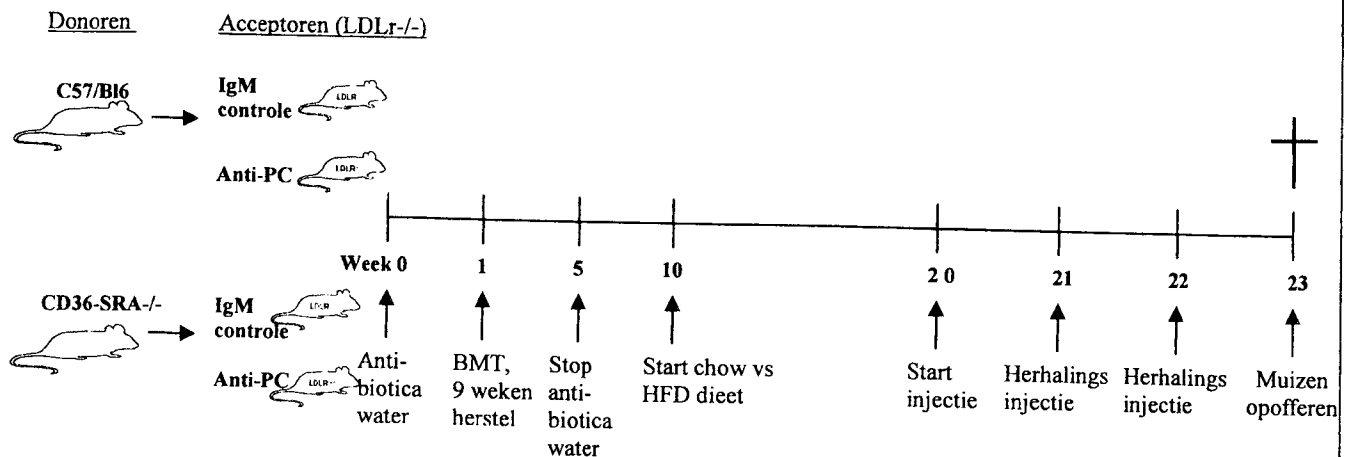
Beenmerg van **CD36-SRA^{-/-} en wildtype C57/Bl6** muizen wordt getransplanteerd in **LDLr^{-/-} muizen**. Er zal één groep zijn die alleen **IgM isotype controle** injecties ontvangt ($n = 13$) of **anti-PC** ($n = 13$). Gedurende de **gehele periode van 13 weken** worden de getransplanteerde LDLr^{-/-} muizen op een chow of hoog vet dieet gezet.

In totaal zullen er 104 LDLr^{-/-} muizen nodig zijn voor het experiment.

Berekening: 2 injectie groepen van elk $n = 13$ en 2 dieet groepen (HFD vs chow) en 2 getransplanteerde muisgroepen (CD36-SRA^{-/-} en wildtype C57/Bl6). In totaal $26 \times 2 \times 2 = 104$ LDLr^{-/-} muizen.

Per donordier kunnen 4 acceptordieren worden voorzien van voldoende beenmergcellen. Dit betekent dat er 20 donormuizen nodig zullen zijn van iedere CD36-SRA^{-/-} en wildtype C57/Bl6 groep.

Berekening: 104 acceptor LDLr^{-/-} muizen / 2 verschillende groepen donormuizen = 52 LDLr^{-/-} muizen die getransplanteerd moeten worden per groep donormuizen. $52/4 = 13$. In totaal zijn er 13 donormuizen nodig van iedere CD36-SRA^{-/-} en wildtype C57/Bl6 groep.



TOTAAL groep 3:
 104 Ldlr^{-/-} muizen
 13 C57/Bl6 muizen
 13 CD36-SRA^{-/-} muizen

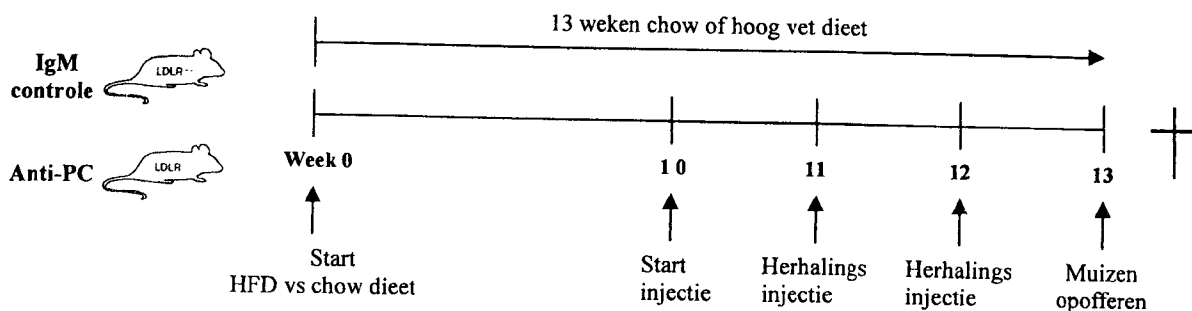
Dierproef

8. Experiment

Experiment 1: Passieve immunisatie met anti-PC antilichamen na inductie van NASH in Ldlr^{-/-} muizen

Eigen onderzoek heeft reeds aangetoond dat actieve immunisatie met geïnactiveerde pneumococci leidt tot een reductie van leverontsteking. Nu willen we hetzelfde aantonen door middel van passieve immunisatie door toediening van anti-PC antilichamen. Om NASH te induceren zullen LDLr^{-/-} muizen voor een periode van 10 weken op een hoog vet dieet gezet worden. Vervolgens krijgen ze 3 maal een wekelijkse injectie van **IgM isotype controle** of **anti-PC antilichamen** via i.p. injecties toegediend. Om te onderzoeken of dit kan leiden tot een mogelijke therapie voor NASH, zal het toedienen van de anti-PC antilichamen dus gebeuren **ná inductie van NASH**.

Groep 1:



De injecties zullen herhaaldelijk toegediend moeten worden (IgM antilichamen zijn geëlimineerd uit het bloed na ongeveer 6 dagen), aangezien er bij immunisatie ook altijd een booster-immunisatie moet gebeuren. De wekelijkse i.p. injecties bestaan uit 400 µg anti-PC antilichamen. De IgM controle wordt geïnjecteerd in dezelfde dosis als de anti-PC antilichamen, zoals beschreven in Faria-Neto JR. *et al* Atherosclerosis 2006.

Voor het immuniseren zullen we de richtlijnen van de "Code of practice voor het immuniseren van proefdieren (Keuringsdienst van Waren)" volgen.

Experiment 2: Cyclodextrine als therapeutisch middel voor NASH

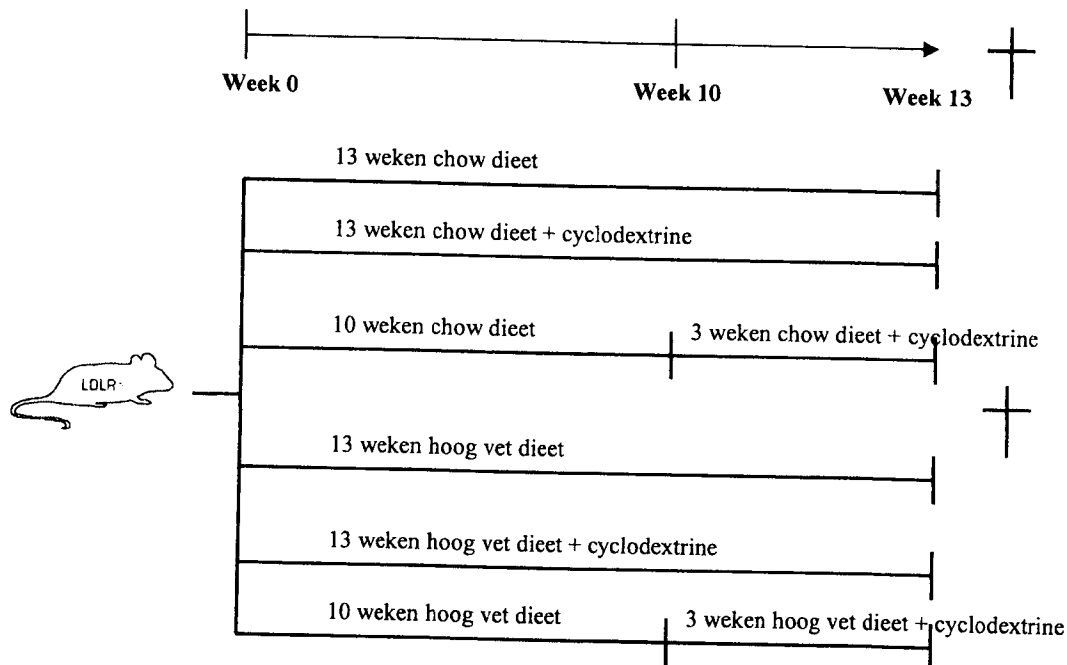
Met dit experiment gaan we onderzoeken wat het effect van cyclodextrine is op LDLr-/- muizen op een hoog vet dieet. Om te onderzoeken of dit kan leiden tot een mogelijke therapie voor NASH, zal het toedienen van cyclodextrine dus gebeuren *voor en ná inductie van NASH*.

Groep 2: Cyclodextrine preventief en ter behandeling

Om NASH te induceren zullen LDLr-/- muizen voor een periode van 13 weken op een hoog vet dieet gezet worden. In de laatste 3 weken van het hoog vet dieet krijgen de muizen een hoog vet dieet *met of zonder cyclodextrine* toegediend. Als controle groep gebruiken we het chow dieet.

Het cyclodextrine supplement zal, naast een behandelmethode, ook worden toegevoegd in het dieet ter preventie. LDLr-/- muizen worden voor de *gehele* periode van 13 weken op een hoog vet dieet *met of zonder cyclodextrine* supplement, gezet. Als controle gebruiken we het chow dieet.

Hoeveelheid cyclodextrine aan dieet toevoegen ; 10% (wt/wt) van het dieet vet (dieet vet in onze studie is 21% boter), gebaseerd op Wagner EM et al. Metabolism 2008.



Experiment 3: Beenmergtransplantatie dieren met WT en CD36-SRA-/- donoren

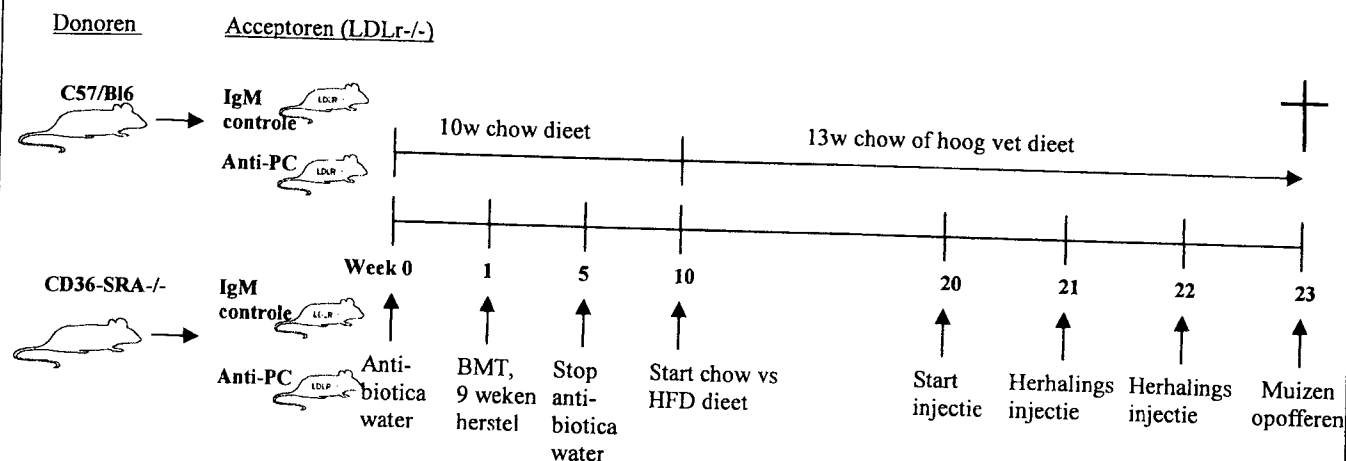
Anti-PC antilichamen spelen waarschijnlijk een belangrijke rol in het blokkeren van de opname van geoxideerd cholesterol door macrofagen. Om dit exacte mechanisme te achterhalen, gaan we twee scavenger receptoren, CD36 en scavenger receptor-A (SR-A), de belangrijkste receptoren die geoxideerd cholesterol opnemen, uit knocken in LDLr-/- muizen door middel van een beenmergtransplantatie. Ter controle worden wild type dieren, C57/Bl6 muizen, gebruikt als donoren. Door anti-PC antilichamen toe te dienen via i.p. injecties in deze getransplanteerde muizen, kunnen we achterhalen of de vermindering van leverontsteking verder gereduceerd wordt door het uitschakelen van scavenger receptoren.

Net als in Experiment 1 en 2 gaan we NASH induceren in LDLr-/- muizen door ze op een hoog vet dieet te zetten.

Voor de beenmergtransplantatie zal plaatsvinden, krijgen de muizen 1 week van tevoren antibiotica water toegediend. Dit gebeurt tot en met de 4^{de} week na de transplantatie. Het beenmerg van CD36-

SRA-/- en C57/Bl6 muizen zal worden getransplanteerd in LDLr-/- muizen. Na een herstelperiode van 9 weken, worden de muizen een chow of hoog vet dieet (HFD) toegediend voor een periode van 13 weken. In week 20 zullen ze hun eerste i.p. injectie krijgen met **IgM isotype controle** of **anti-PC antilichamen**, waarna nog 2 wekelijkse i.p. injecties zullen volgen. Het toedienen van de anti-PC antilichamen gebeurt dus **ná inductie van NASH**.

Groep 3:



Uitgebreide informatie betreffende het uitvoeren van een beenmergtransplantatie kan teruggevonden worden in de SOP over beenmergtransplantatie (SOP Gen-19-M; zie bijlage).

De injecties zullen herhaaldelijk toegediend moeten worden (IgM antilichamen zijn geëlimineerd uit het bloed na ongeveer 6 dagen), aangezien er bij immunisatie ook altijd een booster-immunisatie moet gebeuren. De wekelijkse i.p. injecties bestaan uit 400 µg anti-PC antilichamen. De IgM controle wordt geïnjecteerd in dezelfde dosis als de anti-PC antilichamen, zoals beschreven in Faria-Neto JR. *et al* Atherosclerosis 2006.

Voor het immuniseren zullen we de richtlijnen van de "Code of practice voor het immuniseren van proefdieren (Keuringsdienst van Waren)" volgen.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er wordt geen anesthesie toegepast aangezien dit niet nodig is en slechts belastend voor de dieren zou zijn.

9b. Pijnbestrijding

Pijnbestrijding is niet nodig bij deze experimenten.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Indien de muizen gedurende de proefperiode (herstelperiode van beenmergtransplantatie en dieet) te veel zouden lijden (hetgeen niet voor de hand ligt, omdat het hier om een bekend dieet en bekende techniek gaat) worden zij in overleg met het CPV personeel opgeofferd.

Humane eindpunten: geen exploratief gedrag vertonen, niet eten of drinken, geen urine/faeces produceren, hun lichaamsgewicht afneemt met 20% tov het begintijdpunt.

De dieren die geïmmuniseerd worden, zullen extra in de gaten moeten worden gehouden (volgens de code of practice voor het immuniseren van proefdieren), net als de plaats van injectie. Bij ernstig ongerief dient euthanasie toegepast te worden.

Euthanasie zal plaatsvinden door cervicale dislocatie onder sedatie (1.5% isoflurane, via inhalatie) of O₂/CO₂ euthanasie.

Zorg

10a. Ongerief

Alle muizen worden in groepsverband gehuisvest. Het milde dieet dat wordt toegediend aan de muizen maakt de dieren niet zichtbaar ziek. Dit kan gezien worden als gering ongerief (code 01).

Aan het begin van het onderzoek worden de muizen eenmalig gewogen. Vóór aanvang van injecties worden de muizen nogmaals gewogen, waarna iedere week en vlak voor euthanasie hun lichaamsgewicht wordt bepaald. Bij de cyclodextrine proeven worden de muizen iedere week gewogen. De bloedafname tijdens het experiment zal gebeuren in week 0 vóór aanvang van het chow of hoog vet dieet, na 10 weken dieet en na euthanasie. Dit gebeurt via een staartvene punctie wat kan leiden tot een gering tot matig ongerief (code 02), aangezien de muis in een restrainer wordt gezet en dit zonder verdoving gebeurt.

Driemaal i.p. injecties van IgM isotype controle of anti-PC antilichamen wordt als matig/ernstig gezien (code 04). De hoogste mate van ongerief wordt veroorzaakt door het bestralen van de muizen. Dit ongerief wordt als matig/ernstig gezien (code 04). De donormuizen ondergaan geen experimentele handeling en ondergaan slechts gering ongerief (code 01). Het totale algemene ongerief tijdens dit experiment kan als matig tot ernstig worden beschouwd (code 04).

Experiment 1: Passieve immunisatie met anti-PC antilichamen na inductie van NASH in Ldlr-/- muizen

Groep 1

- hoog vet dieet voor 13 weken → code 01
- bloedafname via staartvene punctie vóór aanvang van het dieet (week 0), tussendoor (week 10) en vlak voor euthanasie (week 13) → code 02
- driemaal i.p. injecties → code 04

Totaal: code 04

Experiment 2: Cyclodextrine als therapeutisch middel voor NASH

Groep 2:

- hoog vet dieet voor 13 weken → code 01
- bloedafname via staartvene punctie vóór aanvang van het dieet (week 0), tussendoor (week 10) en vlak voor euthanasie (week 13) → code 02

Totaal: code 02

Experiment 3: Beenmergtransplantatie met WT en CD36-SRA-/- donoren

Groep 3:

- hoog vet dieet voor 13 weken → code 01
- bloedafname via staartvene punctie vóór aanvang van het dieet (week 10), tussendoor (week 20) en vlak voor euthanasie (week 23) → code 02
- driemaal i.p. injecties → code 04
- bestraling recipients → code 04
- i.v. injecties recipients → code 02
- donormuizen → code 01 (geen handelingen, enkel opofferen via cervicale disclocatie)

Totaal: code 04

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere experimenten en bestaande literatuur zijn geen bijzonderheden te vermelden. De uitval ligt

op 20 % aangezien de muizen worden blootgesteld aan een lethale dosis straling. Door de onmiddellijke toediening van donorbeenmerg en de steriele huisvesting blijft de uitval dus beperkt. Het toegediende dieet leidt niet tot zichtbare ziekteverschijnselen.

11. Verzorging en huisvesting

Standaard CPV, geen bijzonderheden voor niet-bestraalde dieren. Bestraalde dieren krijgen speciaal drinkwater met neomycine en polymyxine B antibiotica (we zuren het drinkwater niet meer aan, aangezien uit vorige experiment (DEC2006-177) blijkt dat dit ervoor zorgt dat de antibiotica minder werkzaam zijn. Huisvesting onder filtertopkooien gedurende hele experiment (voor meer info, zie bijgevoegde SOP). Om gewichtsverlies te minimaliseren, krijgen de muizen t/m de 4^e week na de BMT voer op de kooibodem, zoals beschreven in de richtlijnen van SOP-Gen-19-M. Er is geen speciale huisvesting vereist mbt de anti-PC antilichamen, welke alleen maar een immuunrespons opwekken, en het cyclodextrine additief.

12. Deskundigheid

De uit te voeren experimenten zijn vergelijkbaar met vorige studies, uitgevoerd door VO en VVO. Binnen de _____ zijn er voldoende mensen die deskundig zijn in het uitvoeren van BMT en het toedienen van injecties en afnemen van bloed.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Gekende samenstelling dieet:

caseïne 17% ; DL methionine 0.3% ; sucrose 34% ; zetmeel 14.5% ; cholesterol 0.2% ; cellulose 5% ; CM 205B (mineralen) 7% ; vit 200 1% ; boter 21%

Dosis cyclodextrine ; 10% wt/wt van het dieetvet (21% boter) = + 2.1% (21 g/kg)

Bloedafname:

- dier wordt overgebracht in restrainer
- snede wordt aangebracht in staart
- maximaal 200 µl bloed wordt afgenomen
- dier wordt teruggebracht in kooi.

Opofferen:

Euthanasie zal plaatsvinden door cervicale dislocatie of O₂/CO₂ euthanasie.

BMT: zie bijlage

BIJLAGE

SOP Gen-19-M: Beenmergtransplantatie

Preparation of acceptor mice

Seven days before the bone marrow transfer:

1. Recipient mice are transferred to semi-sterile conditions (e.g. filter top cages).
2. Mice are fed a regular chow diet.
3. Mice are put on autoclaved drinking water (not acidified) to which neomycin (100 mg/l) and polymyxin B sulphate (60,000 U/l) are added (after autoclaving the water), until 4 weeks after the transfer. Minimum twice a week new drinking water is made and provided to the mice in clean bottles.

One day before the bone marrow transfer:

4. In a cross flow, mice are transferred from their filter-top cages to an irradiation box (which can be a plastic box suitable for 5-10 mice).
5. Mice are subjected to a dose of total body irradiation using a röntgen source (6 Gy).
6. After the irradiation, mice are transferred, in the cross flow, back to their filter top cages.

On the morning of the bone marrow transfer:

7. In a cross flow, mice are transferred from their filter-top cages to an irradiation box.
8. Mice are again subjected to a dose of total body irradiation using a röntgen source (6 Gy).
9. After the irradiation, mice are transferred, in the cross flow, back to their filter top cages.

Isolation of bone marrow cells (on the day of the transfer)

1. Sacrifice the donor mice by cervical dislocation after sedation or CO₂/ O₂ asphyxiation (note 1).
2. Cut off the hind legs after removing the skin.
3. Isolate femurs and tibia from the mice and remove most of the skeletal muscles (note 2).
4. Put the bones in PBS, keep on ice and take to flow cabinet.
5. Sterilize the bones by submerging them for 30 seconds in 70% ethanol in a petri dish.
6. Transfer to sterile PBS in a petri dish.
7. Take a bone between forceps, cut off the ends and flush the bone using PBS by inserting a 25G needle at one end.
8. Collect bone marrow in a 50ml tube.
9. Repeat previous steps for all the bones.
10. Make the bone marrow cell suspension single cell by first passing it through a 19G needle, transfer it to a new tube and then pass it through a 25G needle.
11. Count the cells.
12. Spin the cells down at 1000rpm, 5 min at 4°C.
13. Resuspend the cells in RPMI 1640 / 2% FCS / 5U/ml heparin at a density of 5×10^7 cells/ml and keep on ice.

Transplantation of the bone marrow cells

1. Take the cells to cross flow and inject the irradiated mice that have been slightly pre-warmed (note 3), intravenously with 100 μ l of cell suspension using a 27G needle.
2. To stimulate the intake, mice get moistened food on the cage floor next to their regular food for four weeks.
3. Four weeks after transplantation, mice may be removed from the filter top cages, drinking water can be regular again. Experiments start 6 weeks after transplantation (note 4).

Notes

1. On average we inject 5×10^6 cells/recipient mouse. We obtain $2-4 \times 10^7$ cells/donor mouse.
2. Skeletal muscle from the bones is easily removed by rubbing them with a paper tissue.
3. Warming the mice using a heated mat or infrared lights enhances the visibility of the tail vein, highly facilitating the intravenous injections.
4. Ideally, complete chimerism is established, meaning that all hematopoietic cells of the recipient are of donor-origin. However, sometimes chimerism is incomplete or donor cells have only replaced specific lineages of the hematopoietic system. Therefore, it is often important to establish the amount of chimerism in the recipients. This can be done, for example, by transplanting female recipient mice with male donor bone marrow and quantitatively genotyping the bone marrow after transplantation for the presence of Y-markers (by quantitative RT-PCR or Southern blotting). Also other genetic differences between donors and recipients can be used to quantify chimerism.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan: _____

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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*IgM antilichamen en cyclodextrine; mogelijke behandelingen voor NASH*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC vindt de laatste zin van punt 7b erg verwarrend en verzoekt dit aan te passen.
- Punt 7c- In de laatste zin bij groep 2 verzoekt de DEC $6 \times 11 = 44$, aan te passen.

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 2011-133, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



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:

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*IgM antilichamen en cyclodextrine; mogelijke behandelingen voor NASH*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC vindt de laatste zin van punt 7b erg verwarrend en verzoekt dit aan te passen.
 - Dit is als volgt aangepast geworden.
"Voor experiment 3, waarbij beenmerg wordt getransplanteerd, kunnen de donormuizen zowel mannetjes als vrouwtjes zijn (geen voorkeur)."
- Punt 7c- In de laatste zin bij groep 2 verzoekt de DEC $6 \times 11 = 44$, aan te passen.
 - Dit was een typefout en aangepast als zijnde: " *$6 \times 11 = 66$ LDLr-/- muizen.*"

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 **2011-133**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan: :

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
31-10-2011**Project:** *IgM antilichamen en cyclodextrine; mogelijke behandelingen voor NASH.*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM**Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

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

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-133
Diersoort: muis
Aantal dieren: 240
Einddatum: 31-10-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM