

62

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM Versie 2006 Herziene versie	DECNR: 2011-151 Ontvangen: 01-12-2011
--	--

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
12-12-2011	Nieuw	GGO 01-036	

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	31961946N
----------------------	--------------	-----------

Titel van het onderzoek: Optimaliseren van Kupffer cel isolatie uit (vette) levers..

startdatum 11/2011 einddatum ⁹ 11/2015 *Duur van de proef¹⁰: 1 week*

	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.12	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷			Art.9	
4. PI				

Diergroep	In vitro
ctrl/exp/sham	nvt
Diersoort	muis
Stam	C57Bl6
Construct / mutatie ?	LDLR-/-
Herkomst (leverancier) *	01
Aantal	20
Geslacht	Vrouw
Dieren immuuncompetent ?	Ja
Leeftijd/gewicht	8-12 weken
Doel van de proef *	31
Belang van de proef *	01
Toxicologisch onderzoek *	01
Bijzondere technieken *	02
Anesthesie *	02
Pijnbestrijding *	01
Mate ongerief *	02
Toestand dier einde exp*	01

* VHL-coderingen zie bijlage

Verantwoording

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

Titel: Optimaliseren van Kupffer cel isolatie uit (vette) levers.

1. Doel van de proef.

Binnen de groep wordt onder andere onderzoek gedaan naar de rol van verschillende factoren in de ontwikkeling van non alcoholic steatohepatitis (NASH). Dit ziektebeeld gaat gepaard met de aanwezigheid van vetaccumulatie in de lever en ontsteking. Op dit moment is er geen optimale diagnostische methode van een ontstoken vette lever beschikbaar in de kliniek waardoor de diagnose pas gesteld kan worden wanneer de lever ernstig beschadigd is. Hierdoor is er ook nog geen specifieke therapie voorhanden.

Onze eerdere onderzoeken toonden aan dat de ontsteking zich vooral afspeelt in de lever-macrofagen (Kupffer cellen). Deze Kupffer cellen ontwikkelden leverontsteking in muizen nadat ze geactiveerd werden door cholesterolrijke voeding. Bovendien hebben we aangetoond dat de wijze van cholesterol opslag in de Kupffer cellen een belangrijke rol kan spelen tijdens het ontstekingsproces. Met name accumulatie in de lysosomen van Kupffer cellen is gerelateerd aan verhoogde inflammatie.

De isolatie van Kupffer cellen uit de lever blijkt van groot belang om verder onderzoek te verrichten naar de precieze rol van deze cellen in het ontstekingsproces. Daarom willen we tijdens dit project deze methode optimaliseren.

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 ziekte proces van zowel atherosclerose als NASH, is het noodzakelijk om deze cellen te bestuderen zonder de invloed van andere omliggende cellen.

3. Alternatieven

Voor de optimalisatie van deze techniek is het noodzakelijk om genetisch gemodificeerde diermodellen te gebruiken waarbij we een vette lever kunnen induceren. Dit komt doordat er voorheen werd opgemerkt dat er zich in dit geval problemen voordeden bij de isolatie procedure.

Het uiteindelijke doel van de isolatie van Kupffer cellen uit de lever is om deze cellen, afkomstig van een dier uit in vivo experiment, verder in vitro te kunnen gebruiken. Daarom is het noodzakelijk om dit eerst te optimaliseren met behulp van dieren, zodat eens zo ver, dit kan toegepast worden bij het experiment. Bij de procedure werd eerder duidelijk dat we voornamelijk problemen hadden bij levers die vervet waren. Daarom willen we de procedure nu optimaliseren op vervette levers die we verkrijgen uit onze genetisch gemodificeerde dieren op een aangepast dieet.

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 proefdiermodellen te doen (zie punt 5). Op deze manier trachten we het de rol van Kupffer cellen in NASH beter in kaart

te brengen.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De hoge cholesterol waarden in het bloed zijn verantwoordelijk voor de opname van cholesterol in de Kupffercellen, 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), vooraleen het wordt opgenomen door scavenger receptoren op de macrofaag. Het gewone cholesterol (LDL) kan ook wel worden opgenomen door de macrofagen, maar dan via scavenger receptor onafhankelijke manieren, zoals bv macropinocytose. Eens de Kupffer cel geactiveerd is, zal het verder leiden tot de inflammatoire processen die zich afspelen in de lever.

Eerder onderzoek in onze groep toonde aan dat de plaats van cholesterol opstapeling in Kupffer cellen een belangrijke rol speelt in het ontstekingsproces. Zo blijkt dat wanneer cholesterol opgeslagen zit in de lysosomen van de Kupffer cellen, er veel meer ontsteking aanwezig is in vergelijking met wanneer het cholesterol in het cytoplasma opgeslagen zit. Om het effect van andere omliggende cellen (hepatocyten) op deze ontstekingsreactie te vermijden, is het noodzakelijk om de Kupffer cellen te isoleren uit de lever. Deze procedure bracht in het verleden steeds weer problemen op. Daarom willen we tijdens dit project deze techniek optimaliseren (dmv perfusie van de lever) zodat we in de toekomst hiervan gebruik kunnen maken.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC-protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI (zie voorblad).

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Alle gebruikte diersoorten zijn muizen. De stam die gebruikt zal worden is de LDLR knock-out muis (Fok UM). Na de proef worden de dieren opgeofferd.

7b. Sexe

Voor de uit te voeren experimenten worden vrouwtjes gebruikt afhankelijk van de beschikbare hoeveelheid dieren.

7c. Aantallen

Het doel van deze aanvraag is het optimaliseren in het uitvoeren van de isolatie van Kupffer cellen uit de lever. Daarnaast kan van deze dieren ook gebruik worden gemaakt om eventueel beenmerg te isoleren.

In totaal schatten we dat voor de optimalisatie 20 dieren nodig zijn. In het geval van vlotte werking kan dit aantal natuurlijk lager uitvallen.

Dierproef

8. Experiment

De dieren worden op standaard chow of hoog vet dieetvoer (1635) en water gehouden gedurende een korte periode om ontsteking en vervetting van de lever te induceren. Voor de isolatie van Kupffercellen uit de lever zal de lever eerst perfusie ondergaan waarna ze uit de muis zal worden geïsoleerd. Hier kan dan verder mee gewerkt worden in het lab. Voor het isoleren van beenmerg macrofagen worden de botjes uit deze muizen geïsoleerd.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor de perfusie worden de dieren onder narcose gebracht. Voor het inleiden gebruiken we isofluraan 3-4%. Daarna zal isofluraan 1.5-2.5% gebruikt worden om de narcose te onderhouden.

9b. Pijnbestrijding

Bij de dieren die terminale puncties ondergaan zal buprenorfine worden gegeven ter analgesie.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Indien de muizen gedurende de proefperiode (dieet) te veel zouden lijden (hetgeen niet voor de hand ligt, omdat het hier om een bekend dieet gaat) worden zij in overleg met het CPV personeel opgeofferd. Uiterlijke kenmerken waaraan aandacht dient te worden gegeven zijn: uitblijven van exploratief gedrag, niet eten of drinken, geen faeces productie, afname lichaamsgewicht met 20% tov begintijdpunt. Uit eerder onderzoek is gebleken dat deze dieren geen leverfalen ontwikkelen, waardoor we ook nu geen leverfalen of oedeemvorming verwachten.

Euthanasie zal plaatsvinden door cervicale dislocatie of O₂/CO₂ overdosis bij de dieren zonder perfusie. De dieren met perfusie zullen geofferd worden door verbloeding dmv linker/rechter ventrikel of aorta punctie.

10a. Ongerief

Het milde dieet dat wordt toegediend aan de muizen maakt de dieren niet zichtbaar ziek. Dit kan bijgevolg aanzien worden als gering ongerief (code 01). Het onder narcose brengen t.b.v de perfusie zorgt voor matig ongerief (code 02). Dieren die via de portale vene geïnjecteerd worden voor perfusie hebben meer ongerief (code 02).

aard	voeding	narcose	Portale vene canulatie
ernst	01	02	02
duur	1 week	Tijdens perfusie (30min)	Tijdens perfusie (30min)
frequentie	Dagelijks, ad libitum	1x, einde exp	1x, einde exp

Totale ongerief 02.

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere experimenten en bestaande literatuur zijn geen bijzonderheden te vermelden. Het toegediende dieet en de toegediende behandeling leiden niet tot evident zichtbare ziekteverschijnselen.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen sociaal gehuisvest worden in het CPV van de UM onder standaard condities met vrij toegang tot water en voer en een normaal dag/nacht ritme. Bij calamiteiten kan in de eerste plaats worden verwittigd, in geval van afwezigheid kan worden gecontacteerd.

12. Deskundigheid

De uit te voeren experimenten zijn vergelijkbaar met vorige studies, uitgevoerd door mensen binnen de afdeling. De bevoegde personen zijn allen in bezit van artikel 9 en/of 12

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Isolatie beenmerg-macrofagen:

1. Cut off the hind legs after removing the skin.
2. Isolate femurs and tibia from the mice and remove most of the skeletal muscles (note 3).
3. Put the bones in PBS, keep on ice and take to flow cabinet.
4. Sterilize the bones by submerging them for 30 seconds in 70% ethanol in a petri dish.
5. Transfer to sterile PBS in a petri dish.
6. Take a bone between forceps, cut off the ends and flush the bone using PBS by inserting a 25G needle at one end.
7. Collect bone marrow in a 50ml tube.
8. Repeat previous steps for all the bones.
9. 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.
10. Count the cells.
11. Spin the cells down at 1000rpm, 5 min at 4°C.

12. Resuspend the cells in RPMI 1640 / 2% FCS / 5U/ml heparin at a density of 5×10^7 cells/ml and keep on ice.

Portaal vene cannulatie:

Narcose :

- Inleiden met **Isofluraan** 3 - 4 %
- Onderhouden **Isofluraan** 1.5 - 2.5 %

als de muis goed onder narcose is :

- buik open (huid en buikwand vouwen langs middenrif en op thorax leggen),
- darmen naar links op fys. zout doordrengd gaasje om portaal vene bloot te leggen,
- portaal vene wordt gecannuleerd met 30 Gauge (gele) naald, aangesloten op injectiespuit via P10 cannule,
- bloed optrekken en met fys. zout inspuiten ter verificatie plaatsing,
- fixeren naald op vene met weefselijm, en tape om P10 cannule
- perfusie

Opofferen:

De opoffering gebeurt dmv cervicale dislocatie of O_2/CO_2 verstikking of terminale verbloeding.

Euthanasie door verbloeding middels punctie

Aan de muizen wordt eerst buprenorfine gegeven ter analgesie. Muis wordt op de rug gelegd. De status van narcose wordt gecontroleerd en zonodig gecorrigeerd. Incisie in de abdominale huid van peri-umbilicaal tot lateraal over de ribben beiderzijds. Vervolgens wordt het peritoneum tot aan de processus xiphoideus opengelegd. Dan wordt het diafragma langs de ribbenboog afgeknipt. Tot slot wordt het ribrooster bdz. langs het manubrium ingeknipt en omgeklapt, waardoor het hart vrij komt te liggen. Hartpunctie in het rechter of linkerventrikel of aorta met 1 ml spuit met een 30G naald, gecoat met 0.5M EDTA. Centrifuger 5 min. 13000 RPM 4°C; plasma afnemen en invriezen in vloeibaar N_2 ; opslag in -80°C. Organen worden uitgenomen voor verder onderzoek.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-

Uw referentie:

Onze referentie:

Maastricht, 24-11-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Optimaliseren van Kupffer cel isolatie uit (vette) levers*", is op de DEC vergadering van 18 november 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

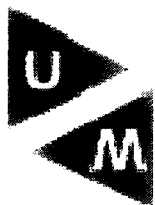
- 1) De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen. (1 week)
- 2) De DEC merkt op dat de VM niet meer werkzaam is bij de Universiteit Maastricht. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- 3) De e-mailadressen op het voorblad zijn niet meer juist. De DEC verzoekt deze aan te passen.
- 4) De DEC wenst, bij punt 3, een onderbouwing waarom deze vraagstelling alleen met een dierexperiment mogelijk is.
- 5) Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. Dit moet in overeenstemming zijn met het voorblad. De DEC schat het totale ongerief in op code 02.

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 2011-151, 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: 043

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 24-11-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Optimaliseren van Kupffer cel isolatie uit (vette) levers*", is op de DEC vergadering van 18 november 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen. *(1 week)*
Dit werd aangepast.
- 2) De DEC merkt op dat de VM niet meer werkzaam is bij de Universiteit Maastricht. De DEC verzoekt dit aan te passen.
Dit werd aangepast.
- 3) De e-mailadressen op het voorblad zijn niet meer juist. De DEC verzoekt deze aan te passen.
Dit werd aangepast.
- 4) De DEC wenst, bij punt 3, een onderbouwing waarom deze vraagstelling alleen met een dierexperiment mogelijk is.
Het uiteindelijke doel van de isolatie van Kupffer cellen uit de lever is om deze cellen, afkomstig van een dier uit in vivo experiment, verder in vitro te kunnen gebruiken. Daarom is het noodzakelijk om dit eerst te optimaliseren met behulp van dieren, zodat eens zo ver, dit kan toegepast worden bij het experiment. Bij de procedure werd eerder duidelijk dat we voornamelijk problemen hadden bij levers die vervet waren. Daarom willen we de procedure nu optimaliseren op vervette levers die we verkrijgen uit onze genetisch gemodificeerde dieren op een aangepast dieet.
- 5) Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. Dit moet in overeenstemming zijn met het voorblad. De DEC schat het totale ongerief in op code 02.
Dit werd aangepast.

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 2011-151, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
14-12-2011Project: *Optimaliseren van Kupffer cel isolatie uit (vette) levers.*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

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

Secretariaat DEC-UM

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-151

Diersoort: muis

Aantal dieren: 20

Einddatum: 12-12-2015

*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

Vicevoorzitter DEC-UM