

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM⁸

DECNR: 2011-034

Ontvangen: 01-03-2011

Herziene versie

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²
07-04-2011	Herziene

VROM/GGONR ³
08-071/1

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject	3.					
-------------	----	--	--	--	--	--

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

Budgetnummer	3098.3276.B
--------------	-------------

Titel van het onderzoek:

The function of BIM and MCL-1 deficiency in atherosclerosis development and on the immune system

Startdatum **08-04-2011** einddatum ⁹ **15-06-2013** Duur van de proef ¹⁰: 17 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. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. overige uitvoerenden				Art. 9	
5.				Art.9	

Groep	Recipients BMT (studie 1 en 2)				Recipients BMT (studie 3; homing repopulatie)				Donoren BMT				In Vitro			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Diergroep	Recipients CTRL	Recipients LysM -BIM	Recipients BIM-/-	Recipients LysM-MCL1	Recipients CTRL	Recipients LysM -BIM	Recipients BIM-/-	Recipients LysM-MCL1	WT	LysM -BIM	BIM-/-	LysM-MCL1	WT	LysM -BIM	BIM-/-	LysM-MCL1
ctrl/exp/sham	CTRL	EXP	EXP	EXP	CTRL	EXP	EXP	EXP	CTRL	EXP	CTRL	EXP	CTRL	EXP	CTRL	EXP
Diersoort	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6
Construct / mutatie ?	LDLr ^{-/-}	LysM Cre BIM f/f	BIM-/-	LysM Cre MCL1 f/f	LDLr ^{-/-}	LysM Cre BIM f/f	BIM-/-	LysM Cre MCL1 f/f	LDLr ^{-/-}	LysM Cre BIM f/f	BIM-/-	LysM Cre MCL1 f/f	LDLr ^{-/-}	LysM Cre BIM f/f	BIM-/-	LysM Cre MCL1 f/f
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Aantal	35*	35*	15	15	10	10	10	10	12	12	7	7	10	10	10	10
Geslacht	V	V	V	V	V	V	V	V	M	M	M	M	M/V	M/V	M/V	M/V
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Leeftijd/gewicht	>8wk	>8 wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8 wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk	>8wk
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	09	09	09	09	09	09	09	09	02	02	02	02	02	02	02	02
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	04	04	01	01	01	01	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Mate ongerief *	04	04	04	04	05	05	05	05	01	01	01	01	01	01	01	01
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01

* = 1x15 + 1x20 dieren

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: The function of BIM and MCL1 deficiency in atherosclerosis development in the immune system

1. Doel van de proef.

Atherosclerose is een belangrijke oorzaak van ziekte en sterfte in de westerse wereld. Van diverse witte bloedcelpopulaties is inmiddels een belangrijke rol aangetoond in de ontwikkeling en progressie van deze pathologie. Het doel van dit onderzoek is om de functie van BIM en MCL-1 te onderzoeken in atherosclerose en meer in het bijzonder gerelateerd aan de effecten die deze genen hebben op celdood en celoverleving.

Met dit onderzoek willen we de laatste vragen omtrent functionaliteit en rol van de verschillende type bloedcellen in vitro en in vivo aantonen. Verder willen we voor BIM nog meer in diepte kijken naar de effecten van dit gen op de ontwikkeling van atherosclerose.

Deze vraag zouden we willen onderzoeken aan de hand van uitschakeling van deze genen in de bloedcellen door middel van een beenmergtransplantatie. Er zal gekeken worden naar de verschillen in ontwikkeling van bloedcellen onder invloed van deze genotypes, zowel in vitro als in vivo. Daarnaast zal er voor BIM nog gekeken worden naar de ontwikkeling van plaques onder invloed van de uitschakeling in de bloedcellen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Hart- en vaatziekten, en de onderliggende oorzaak atherosclerose vormen al sinds vele jaren een zeer belangrijke doodsoorzaak in de Westerse wereld. Met dit onderzoek willen wij een bijdrage leveren aan de nog incomplete wetenschappelijke kennis omtrent atherosclerose en meer in het bijzonder de relatie tussen de genen BIM en MCL1, witte bloedcellen en de ontwikkeling van atherosclerose, die mogelijk tot de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor de behandeling van deze ziekte kunnen leiden. Aangezien op basis van de beschikbare literatuur in Leiden en Amsterdam er een belangrijke functie blijkt te zijn in het ontstaan en de progressie van atherosclerose en cel overleving.

De beide genen zijn in muis en mens sterk vergelijkbaar en het proefdiermodel is representatief voor de humane pathofysiologie, hetgeen extrapolatie van de resultaten van de voorziene studie naar de mens toelaat. Daarnaast bieden positieve resultaten van dit diervorm de mogelijkheid om te komen tot nieuwe behandelmethoden en inzichten bij de mens.

3. Alternatieven

Atherosclerose is een complexe ziekte waarbij veel verschillende cellen en orgaansystemen een rol spelen. Door deze hoge mate van complexiteit is het niet altijd mogelijk om gebruik te maken van alternatieve methodes aangezien deze nooit het volledige beeld van interacties kunnen laten zien, zoals deze in de mens spelen.

Een mogelijk alternatief voor de werking van de deze beide genen is celkweek. Via in vitro studies kan echter alleen op celniveau gekeken worden en niet zoals noodzakelijk op systemisch niveau, waardoor het vrijwel onmogelijk wordt om de resultaten te kunnen extrapoleren naar de menselijke situatie. Om deze zelfde reden is het ook niet mogelijk om gebruik te maken van weefselkweek. Wel opteren we waar mogelijk voor in vitro onderzoeken met name aan deelprocessen in atherosclerose zoals apoptose en celoverleving, om zo het aantal benodigde dieren te kunnen verminderen. Vandaar ook dat we willen proberen om een belangrijk gedeelte

van het onderzoek uit te voeren middels in vitro experimenten.

Door gebruik te maken van de kennis en expertise die in Leiden, Amsterdam en Maastricht reeds is opgedaan omtrent het werken met het deze en vergelijkbare diermodellen is het mogelijk om vooraf de variaties beter in te schatten wat leidt tot vermindering van het aantal te gebruiken proefdieren. Daarnaast wordt er intensief samengewerkt met ervaren collega's om het ongerief van de dieren zoveel mogelijk te beperken en waar mogelijk te verminderen.

4. Ethische afweging

Atherosclerose vormt als onderdeel van de hart- en vaatziekten een groot probleem voor de samenleving. Patiënten kunnen zeer diversen problemen krijgen en het risico op overlijden is nog altijd groot. De beschikbare behandelingen zijn veelal invasief en bieden niet altijd een langdurig positief resultaat. Daarnaast heeft de ziekte mede hierdoor ook effecten op de sociale omgeving van de patiënt. Het is dus van belang om beter inzicht te krijgen in de ontwikkeling, progressie en eventuele behandeling van atherosclerose. De verwachting is dat dit onderzoek niet alleen kan leiden tot mogelijk verbeterde inzichten in deze pathologie, maar eveneens tot nieuwe behandelingswijzen voor atherosclerose met name aangezien de te verwachten effecten van ingrijpen op het niveau van celdood en celoverleving zeer belangrijk kunnen zijn. Aangezien atherosclerose een hoge complexiteit heeft, is het noodzakelijk om (een gedeelte van) het onderzoek in vivo uit te voeren. Hierdoor kunnen alle mogelijke systemische invloeden integraal worden meegenomen en wordt de extrapoleerbaarheid naar de humane situatie verder vergroot. De dieren welke gebruikt zullen worden voor het onderzoek zullen matig tot ernstig ongerief ondervinden als gevolg van de beenmergtransplantatie en de behandeling met het cytostaticum cyclophosphamide. Hierbij zal geprobeerd worden om het ongerief van de dieren zoveel mogelijk te beperken. Als er een afweging gemaakt wordt tussen het maatschappelijk belang van het vinden van voortschrijdende inzichten in atherosclerose en het matig tot ernstig ongerief van de proefdieren dan zijn de onderzoekers van mening dat dit onderzoek ethisch gerechtvaardigd is, door de potentiële bijdrage aan de kennis en inzichten omtrent atherosclerose en de perspectieven om te komen tot nieuwe interventies op het gebied van hart- en vaatziekten.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Atherosclerose is een vasculaire aandoening die tegenwoordig wordt gezien als een chronische ontstekingsziekte, waarbij er een ophoping van lipiden en ontstekingscellen in de vaatwand optreedt. Voor het ontstaan en de progressie van atherosclerose zijn de verschillende witte bloedcellen erg belangrijk aangezien deze in alle stadia van de ziekte een verschillende bijdrage leveren aan het ziektebeeld en de stabiliteit van de uiteindelijke plaque.

Binnen deze studie zal er gekeken worden naar twee verschillende genen die van invloed zijn op immunologische processen die direct te maken hebben met de ontwikkeling van atherosclerose. De genen, BIM en MCL-1, zijn respectievelijk pro- en anti-apoptotisch, oftewel ze stimuleren celdood of celoverleving. Hierdoor kunnen deze genen ontstekingsreactie, zoals atherosclerose beïnvloeden. In eerdere studies naar deze genen is er al gekeken naar de directe effecten op atherosclerose. Om meer inzicht te krijgen in de werkingsmechanismen en de complete effecten op het immuunsysteem, willen we in deze studie kijken naar de in vivo celdood, celoverleving en migratie van witte bloedcellen onder invloed van het volledig of gedeeltelijk uitschakelen van deze genen. Hierbij zal er gebruik worden gemaakt van $LDLr^{-/-}$ muizen welke een beenmergtransplantatie ondergaan. Dit vanwege het feit dat op deze manier de resultaten van de verschillende studies het eenvoudigst en het beste met elkaar te vergelijken zijn waardoor er

minder dieren noodzakelijk zijn om te kunnen komen tot definitieve uitspraken omtrent de effecten van BIM en MCL-1 op enerzijds atherosclerose en anderzijds op de effecten van deze genen op het immuunsysteem.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het project is gelezen en akkoord bevonden door

Principaal onderzoeker (PI)
van de Universiteit Maastricht.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Gebruikt worden LDLr knock-out muizen (LDLr^{-/-}) met een C57Bl6 achtergrond, omdat deze muizen onder invloed van een cholesterolrijk dieet atherosclerose ontwikkelen op een manier die vergelijkbaar is met de menselijke (hypercholesterolemische) situatie. De dieren zullen worden geleverd vanuit de fok van pathologie bij het CPV of ze zullen besteld worden bij Jackson's Laboratories, afhankelijk van de beschikbaarheid binnen het CPV op het moment dat de muizen nodig zijn. Daarnaast zullen als donor voor de beenmergtransplantaties vier verschillende genotypes gebruikt worden te weten, LysM Cre BIM^{fl/fl}, BIM^{-/-}, LysM Cre MCL1^{fl/fl} en wildtype muizen welke verkregen zullen worden van de fok voor deze dieren welke gehuisvest is in het dierenlaboratorium van de Universiteit van Leiden. Voor de LysM Cre BIM^{fl/fl} zal er ook een atherosclerose onderzoek worden uitgevoerd. Tot slot zullen er muizen van deze laatste vier genoemde genotypes gebruikt worden voor in vitro assays. Aangezien de dieren aan het einde van het experiment geofferd zullen worden, zijn ze niet beschikbaar voor hergebruik.

7b. Sexe

Om het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken gaat de voorkeur uit naar het gebruik van één geslacht voor de in vivo experimenten. Atherosclerotische plaques verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke LDLr^{-/-} muizen. Het gebruik van twee geslachten zal resulteren in een grotere standaard variatie en dus in een hoger aantal benodigde muizen. Omdat de ervaring leert dat plaqueontwikkeling binnen vrouwelijke muizen iets minder variabel lijkt te zijn gaat onze voorkeur uit naar vrouwelijke LDLr^{-/-} muizen voor de studie. Daarnaast willen we ook in de andere in vivo studies waarbij gekeken wordt naar perifere effecten de variatie beperken en zullen we dus ook hier gebruik maken van dieren van één geslacht. Hierdoor is het ook mogelijk om de data makkelijker te vergelijken met reeds eerder verkregen data in Leiden en Amsterdam. Om het chimerisme te kunnen bepalen wordt er gebruik gemaakt van mannelijke donoren.

Voor de in vitro experimenten zullen muizen van beide geslachten gebruikt worden aangezien er geen indicaties zijn voor verschillen tussen de geslachten met betrekking tot in vitro onderzoeken.

7.c. Aantallen

Er zullen drie verschillende in vivo experimenten worden uitgevoerd en een aantal in vitro experimenten;

- 1.) Atherosclerose ontwikkeling onder invloed van BIM deficiëntie in bloedcellen.
- 2.) Ontwikkeling en migratie van witte bloedcellen in de vier eerder genoemde genotypes.
- 3.) Homing en repopulatie van witte bloedcellen na tijdelijke depletie van de circulerende bloedcellen.
- 4.) In vitro studies

1.) Atherosclerose ontwikkeling onder invloed van LysM Cre BIM f/f deficiëntie in bloedcellen
Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van BIM deficiëntie in (een gedeelte van de) witte bloedcellen op de ontwikkeling van atherosclerose zal er een beenmergtransplantatie studie worden uitgevoerd met bovengenoemd genotype. (de overige genotypes zijn reeds in eerdere studies geanalyseerd met betrekking tot directe atherosclerose ontwikkeling). Per genotype zijn er 5 donoren en 20 recipients (LDLr/- muizen) noodzakelijk.

Experiment 1: Atherosclerose	Controle (WT)	LysM Cre BIM f/f	Totaal
Donoren	5	5	10
LDLr/- muizen (recipients)	20	20	40
Totaal	25	25	50

Voor deze studie wordt gewerkt met een significantie (α) van 0,05 en een power van 0,80.

2.) Voor de tweede studie waarbij gekeken zal worden naar migratie, celdood en celoverleving zal er gebruik gemaakt worden van alle vier de beschreven genotypes (WT; BIM^{-/-}; LysM Cre BIM^{f/f} en LysM Cre MCL-1^{f/f}). Ook voor deze studies zal er een beenmergtransplantatie worden uitgevoerd om de studie zoveel mogelijk gelijk te houden met eerder uitgevoerde studies. Per genotype zijn er 4 donoren en 15 recipients (LDLr/- muizen) noodzakelijk.

Experiment 2: Ontwikkeling en migratie	Controle (WT)	LysM Cre BIM ^{f/f}	BIM ^{-/-}	LysM Cre MCL-1 ^{f/f}	Totaal
Donoren	4	4	4	4	16
LDLr/- muizen (recipients)	15	15	15	15	60
Totaal	19	19	19	19	76

Voor deze studie wordt gewerkt met een significantie (α) van 0,05 en een power van 0,80.

3.) In de derde studie zal er gekeken worden naar homing en repopulatie van witte bloedcellen na eenmalige depletie van deze cellen met cyclophosphamide. Hierbij zal er in alle vier de beschreven genotypes (WT; BIM^{-/-}; LysM Cre BIM^{f/f} en LysM Cre MCL-1^{f/f}) gekeken worden. Ook deze studie zal worden uitgevoerd nadat er eerst een beenmergtransplantatie heeft plaatsgevonden om de situatie zoveel mogelijk gelijk te houden met eerdere studies. Per genotype zijn er 3 donoren en 10 recipients (LDLr/- muizen) noodzakelijk.

Experiment 2: Homing en repopulatie	Controle (WT)	LysM Cre BIM ^{f/f}	BIM ^{-/-}	LysM Cre MCL-1 ^{f/f}	Totaal
Donoren	3	3	3	3	12
LDLr/- muizen (recipients)	10	10	10	10	40
Totaal	13	13	13	13	52

Voor deze studie wordt gewerkt met een significantie (α) van 0,05 en een power van 0,80.

4.) Voor de in vitro analyse van beenmerg cellen zal er gebruik worden gemaakt van 10 donoren per genotype. In totaal zijn er dus $4 \times 10 = 40$ muizen noodzakelijk voor de in vitro migratie, celdood en celoverleving experimenten.

Powerberekening:

1.) Voor de studie naar atherosclerose ontwikkeling in LDLr/- muizen welke beenmerg ontvangen van WT of LysM Cre BIM^{f/f} donoren zullen de volgende aantallen dieren noodzakelijk zijn:

Op basis van eerdere beenmergtransplantaties binnen onze groep weten we dat de gemiddelde $\sigma =$

47,5 en $\delta = 45$ (plaque area als parameter). Volgens de formule van L. Sachs ($n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$ met (80% betrouwbaarheid): $F 0.8 = 15.7$. $n = 15.7 * (\sigma/\delta)^2$) hebben we $n = 15.7 (47.5/45)^2$ muizen nodig, hetgeen overeenkomt met een totaal aantal van ($n =$) 17,5 dieren per groep. Met in acht name van 10% uitval kunnen we bepalen dat we 19,4 dieren nodig hebben. Dus 20 dieren per groep zou voldoende moeten zijn voor de geplande beenmergtransplantatie studie. Op basis van ervaringen binnen de groep weten we dat 5 donormuizen voldoende moeten zijn voor 20 ontvangers. Het LysM Cre BIM^{ff} beenmerg zullen we ontvangen van de Universiteit van Leiden. Voor het WT beenmerg zullen 5 littermates van de knock-out muizen gebruikt worden of wanneer deze niet (voldoende) beschikbaar zijn C57Bl6 muizen van Jackson Laboratories.

2.) Voor de studie waarbij gekeken wordt naar migratie, celdood en celoverleving van witte bloedcellen in LDLr^{-/-} muizen na een beenmergtransplantatie zijn de volgende aantallen dieren noodzakelijk:

De gemiddelde $\sigma = 15,9$ en $\delta = 17,2$ (%apoptotische cellen) op basis van eerdere studies binnen onze groep. Volgens de formule van L. Sachs ($n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$ met (80% betrouwbaarheid): $F 0.8 = 15.7 \rightarrow n = 15.7 * (\sigma/\delta)^2$) hebben we $n = 15.7 (15,9/17,2)^2$ muizen nodig, hetgeen overeenkomt met een totaal aantal van ($n =$) 13,42 dieren per groep. Met in acht name van 10% uitval kunnen we bepalen dat we 14,76 dieren nodig hebben. Dus 15 dieren per groep zou voldoende moeten zijn voor de geplande studie. Op basis van eerdere ervaringen weten we dat 1 donor per 4 ontvangers voldoende zou moeten zijn; dus 3,75 donoren per 15 ontvangers. We zullen daarom 4 donoren per genotype nodig hebben.

3.) Voor de studie waarbij gekeken wordt naar homing en repopulatie van witte bloedcellen in LDLr^{-/-} muizen na een beenmergtransplantatie zijn de volgende aantallen dieren noodzakelijk:

De gemiddelde $\sigma = 4,9$ en $\delta = 6,7$ (%monocyten) op basis van eerdere studies binnen onze groep. Volgens de formule van L. Sachs ($n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2$ met (80% betrouwbaarheid): $F 0.8 = 15.7 \rightarrow n = 15.7 * (\sigma/\delta)^2$) hebben we $n = 15.7 (4,9/6,7)^2$ muizen nodig, hetgeen overeenkomt met een totaal aantal van ($n =$) 8,4 dieren per groep. Met in acht name van 10% uitval kunnen we bepalen dat we 9,24 dieren nodig hebben. Dus 10 dieren per groep zou voldoende moeten zijn voor de geplande studie. Op basis van eerdere ervaringen weten we dat 1 donor per 4 ontvangers voldoende zou moeten zijn; dus 2,5 donoren per 10 ontvangers. We zullen daarom 3 donoren per genotype nodig hebben.

4.) Verder zullen er $4 \times 10 = 40$ dieren gebruikt worden als (beenmerg)donor voor de in vitro onderzoeken. Dit aantal levert voldoende beenmerg om te kweken en alle noodzakelijke experimenten met betrekking tot migratie, celdood en celoverleving uit te voeren. De aantallen zijn gebaseerd op ervaringen binnen de afdeling met het kweken van beenmerg en de hoeveelheid cellen die hiermee verkregen kunnen worden.

TOTAAL:

In totaal zullen voor deze studie naar BIM en MCL-1 ($50+76+52+40=$) 218 dieren worden gebruikt.

Dierproef

8. Experiment

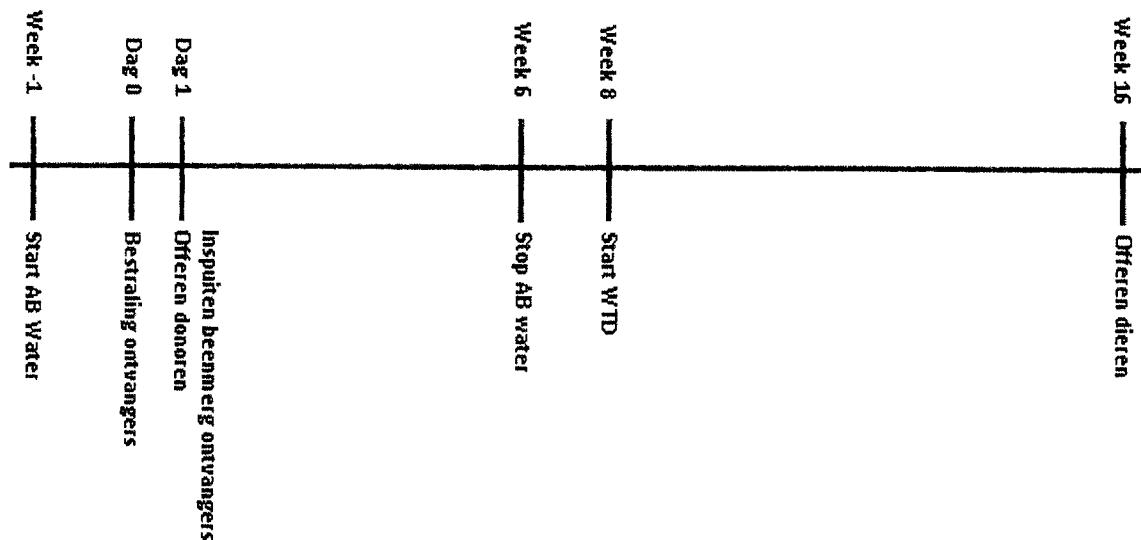
1.) Atherosclerose studie onder invloed van LysM Cre BIM^{f/f}

De dieren zullen onder filtertop gehuisvest moeten worden, vanwege de beenmergtransplantatie.

Ontvangers: LDLr^{-/-} (2 x 20 muizen)

Donoren: WT (5 muizen)

LysM Cre BIM^{f/f} (5 muizen)



Week -1: Start AB water ontvangers BMT

Dag 0: Bestraling ontvangers (6 Gy)

Dag 1: Tweede bestraling ontvangers (6 Gy) Offeren donoren en isoleren beenmergcellen + injecteren cellen in ontvangers

Week 6: Einde AB water

Week 8: Start WTD

Week 16: Offeren muizen

Bij het offeren van de dieren zullen tevens hart, peritoneale macrofagen, milt, lever, lymfeknopen en bloed worden geïsoleerd.

2.) Ontwikkeling en migratie van witte bloedcellen in de verschillende genotypes

De dieren zullen onder filtertop gehuisvest moeten worden, vanwege de beenmergtransplantatie.

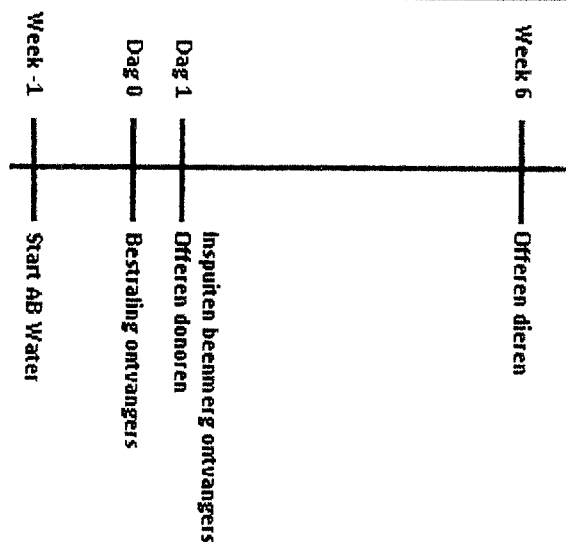
Ontvangers: LDLr^{-/-} (4 x 15 muizen)

Donoren: WT (4 muizen)

LysM Cre BIM^{f/f} (4 muizen)

BIM^{-/-} (4 muizen)

LysM Cre MCL-1^{f/f} (4 muizen)



Week -1: Start AB water ontvangers BMT

Dag 0: Bestraling ontvangers (6 Gy)

Dag 1: Tweede bestraling ontvangers (6 Gy) Offeren donoren en isoleren beenmergcellen + injecteren cellen in ontvangers

Week 6: Offeren muizen

Bij het offeren van de dieren zullen tevens hart, peritoneale macrofagen, milt, lever, lymfe knopen en bloed worden geïsoleerd.

3.) Homing en repopulatie van witte bloedcellen na tijdelijke depletie middels een eenmalige injectie met cyclophosphamide

De dieren zullen onder filtertop gehuisvest moeten worden, vanwege de beenmergtransplantatie.

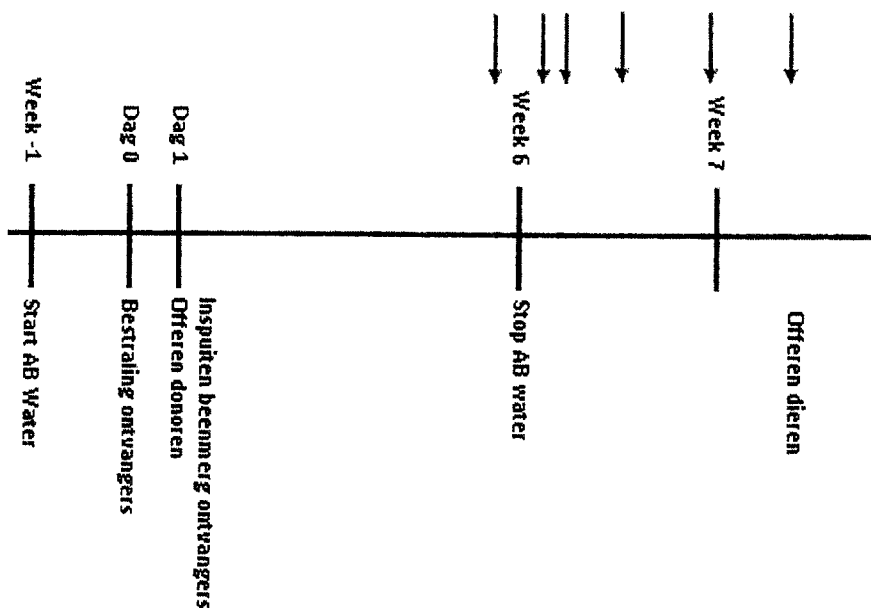
Ontvangers: $LDLr^{-/-}$ (4 x 10 muizen)

Donoren: WT (3 muizen)

LysM Cre $BIM^{f/f}$ (3 muizen)

$BIM^{-/-}$ (3 muizen)

LysM Cre $MCL-1^{f/f}$ (3 muizen)



- Week -1: Start antibiotica behandeling, tot week 6 + 2 dagen
- Week 0: Bestraling dieren met 6 Gy
- Week 0 + 1 dag: Tweede bestraling ontvangers (6 Gy) Transplantatie van beenmerg cellen
- Week 6 – 1dag: Afname bloedmonster; Baseline (n = 4 muizen per groep)
- Week 6: Cyclophosphamide behandeling (eenmalige i.p. injectie)
- Week 6 + 1 dag: Afname bloedmonster (n = 4 muizen per groep)
- Week 6 + 2 dag: Afname bloedmonster (n = 4 muizen per groep)
- Week 6 + 4 dag: Afname bloedmonster (n = 4 muizen per groep)
- Week 6 + 7 dag: Afname bloedmonster (n = 4 muizen per groep)
- Week 6 + 10 dag: Offeren van dieren en extractie van carotiden, aortaboog, hart, milt, lymfeknopen en bloed.

De dieren zullen vanaf week 6, gehuisvest dienen te worden in de DMII ruimte vanwege de toediening van het cytostaticum cyclophosphamide. De dieren zijn na 7 dagen weer schoon en kunnen dus voor het offeren terug worden verplaatst naar de normale experimentele omstandigheden. De bloedafnames zullen plaatsvinden via een roulerend schema, waardoor de muizen normaal gesproken maar op 2 van de 5 momenten een bloedafname zullen ondergaan.

Per groep zal het schema er (bijvoorbeeld) als volgt uit zien:

Moment	Muis 1	Muis 2	Muis 3	Muis 4	Muis 5	Muis 6	Muis 7	Muis 8	Muis 9	Muis 10
WK 6 – 1	X	X	X						X	
WK 6 + 1				X		X	X	X		
WK 6 + 2		X			X				X	X
WK 6 + 4	X		X			X		X		
WK 6 + 7				X	X		X			X

Een muis zal dus nooit twee keer achter elkaar gebruikt worden en tevens zal er voldoende variatie.

4.) In vitro onderzoeken

Er zal van $4 \times 10 = 40$ muizen beenmerg worden verzameld. Dit beenmerg zal vervolgens in kweek gebracht worden voor verdere in vitro studies, en dan meer in het bijzonder migratie, celdood en celoverleving assays met beenmerg macrofagen.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voorafgaand aan het offeren zullen de dieren onder anesthesie worden gebracht middels een intra-peritoneale injectie (i.p.) met pentobarbital (150 mg/kg).

9b. Pijnbestrijding

Er zal geen standaard pijnbestrijding worden toegediend aan de dieren. Dit vanwege het feit dat de beenmergtransplantatie en de behandeling met cyclophosphamide hier geen noodzaak voor geven. Wel worden de dieren op regelmatige basis gecontroleerd om te monitoren of er geen te hoog ongerief voor de dieren is of in het geval van de humane eindpunten zal een dier uit experiment genomen worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Overdosis pentobarbital (150 mg/kg).
- De dieren zullen op regelmatige basis gecontroleerd worden voor activiteit, gewichtsverlies, voedsel- en waterconsumptie, conditie van de vacht en slijmvliezen en algeheel gedrag.
- Dieren zullen (in overleg met de onderzoeker en indien noodzakelijk de artikel 14 functionaris) uit experiment genomen worden indien er sprake is van:
 - meer dan 20% gewichtsverlies binnen 1 week
 - meer dan 10% gewichtsverlies binnen 1 dag
 - geen voedsel en waterconsumptie gedurende minimaal twee dagen
 - (infectieuze) ziekte, die niet behandelbaar is en tevens deze of andere experimenten kan beïnvloeden.

Na de verschillende behandelingen dient er allereerst gelet te worden op activiteit, gewichtsverlies, voedsel- en waterconsumptie, conditie van de vacht en slijmvliezen en algeheel gedrag. Na het induceren van de depletie van witte bloedcellen middels cyclophosphamide injectie kunnen de dieren tijdelijk minder actief zijn. Er worden echter geen grote veranderingen in gedrag en/of activiteit verwacht.

Wanneer er echter toch sprake is van ernstige veranderingen in activiteit, gewicht, voedsel- en waterinname en algehele conditie is dit aanleiding om de dieren uit experiment te nemen.

In alle gevallen geldt dat voor dieren waarbij veranderingen optreden in activiteit, gewichtsverlies, voedsel- en waterconsumptie, conditie van de vacht en slijmvliezen en algeheel gedrag in overleg met VO, VVO en/of artikel 14 functionaris uit experiment genomen worden.

Zorg

10a. Ongerief



Alle muizen zullen in groepen worden gehuisvest. De beenmergtransplantatie en de hieraan voorafgaande bestraling, die permanente schade aan het immuunsysteem oplevert, zal matig tot ernstig ongerief (=04) veroorzaken bij de dieren. De dieren waarbij een tijdelijke depletie van witte bloedcellen middels cyclophosphamide injectie zal worden geïnduceerd zullen ernstig ongerief (=05) ondervinden van deze injectie, ~~na afname van de tijdelijke depletie van witte bloedcellen en de hierbij gepaard gaande fysieke beperkingen.~~ Verder zullen de dieren matig tot ernstig ongerief (=04) ondervinden van de bloedafnames voornamelijk door frequentie (2 tot maximaal 3 momenten, bij uitval van andere dieren, per dier). Tot slot zullen de dieren gering ongerief (=01) ondervinden van het inleiden voor de narcose voorafgaand aan de ingrepen en de euthanasie onder narcose.

Het (maximale) ongerief van de studies is dus in te schalen als ernstig ongerief (=05), voor studie 3, voor de overige studies is het maximale ongerief matig tot ernstig ongerief (=04). Voor het in vitro onderzoek zullen de dieren onder anesthesie geofferd worden wat gering (=01) oplevert.

Groep(en)	Handeling (aard, duur, frequentie)	Ongeriefscore
1 – 8	Bestraling	04
1 – 8	Injectie (i.v.) beenmergcellen	02
5 – 8	Injectie (i.p.) cyclophosphamide	05
5 – 8	Bloedafname (2 afnames per muis)	04
1 – 16	Inleiden narcose/overdosis pentobarbital, eenmalig	01
1 – 16	Euthanasie onder narcose, eenmalig. Waarbij de groepen 1 – 8 gebruikt zullen worden voor de in vivo onderzoeken, groepen 9 – 12 gebruikt zullen worden als donoren voor de BMT en de groepen 13 – 16 voor de in vitro onderzoeken.	01

10b. Welzijnsevaluatie

Op basis van ervaringen binnen andere afdelingen en de eigen afdeling worden over het algemeen geen afwijkingen of ernstig zieken dieren verwacht. Het is aan de andere kant niet uitgesloten dat er in individuele gevallen dieren kunnen zijn die als gevolg van de BMT de volgende symptomen van ziekte/verminderde gesteldheid vertonen gekromde rug/ afwijkende gang/ achterblijven/ mager/wegkwijnen, trager, twitch, wincing. Hierbij kan het noodzakelijk zijn als de humane eindpunten worden bereikt om deze dieren uit experiment te nemen. Verder weten we van eerdere studies dat het ook mogelijk is dat er één of enkele dieren kunnen overlijden als gevolg van de BMT. Tot slot blijkt uit de opgedane ervaring dat de ingeschatte ongeriefscore voor de injecties en de hiermee samenhangende ingrepen realistisch is. Er zal een welzijnsdagboek worden bijgehouden van alle dieren en na afloop van het experiment zal er een evaluatie geschreven worden.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden gehuisvest en verzorgd in de Centrale Proefdier Voorziening (CPV) van de Universiteit Maastricht (UM). De dieren zullen een normaal dieet krijgen, waarbij water en voer ad libitum beschikbaar is. De dieren, welke een beenmergtransplantatie ondergaan, zullen onder filtertop gehuisvest worden tot en met het einde van de herstelperiode (6 weken na de beenmergtransplantatie). Daarnaast zal er in de eerste dagen na de BMT gewerkt worden met geweekte brokken op de bodem van de kooi of eventueel gelpads. Voor de atherosclerose studie geldt dat de dieren vanaf week 8 western type diet (0,25% cholesterol) zullen krijgen om op deze wijze atherosclerose te induceren.

De verantwoordelijk onderzoeker (VO) (en/of diens vervanger (VVO)) dragen zorg voor de controle op de dieren in de proef in overleg met de medewerkers van het CPV. Ten tijde van de cyclophosphamide behandeling zullen de dieren meer frequent (minimaal 1 maal per dag) gemonitord worden. In geval van calamiteiten dient de VO of de VVO gewaarschuwd te worden en indien noodzakelijk de artikel 14 functionaris.

12. Deskundigheid

Alle deelnemende onderzoekers hebben de bevoegdheid om te werken met proefdieren (art. 9 of art. 12). Specifieke procedures zullen worden uitgevoerd door de onderzoekers met (ruime)

bekwaamheid in het uitvoeren van deze handelingen en/of operaties.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Been merg transplantatie: SOP zoals te vinden op de website van het CPV en bijgesloten

Offeren: De dieren zullen worden geëuthaniseerd middels een overdosis pentobarbital (150 mg/kg)

Relevante literatuur

- M. Westra – PhD Thesis. Apoptosis and atherosclerosis
- 'code of practice immuniseren van proefdieren'. www.cpv.unimaas.nl

SOP

Bone marrow transplantation

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.

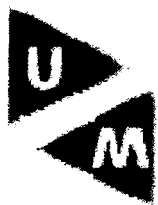
9. Repeat previous steps for all the bones.
10. Make the bone marrow cell suspension single cell by first passing it through a 19G needle, transfer it to a new tube and then pass it through a 25G needle.
11. Count the cells.
12. Spin the cells down at 1000rpm, 5 min at 4°C.
13. Resuspend the cells in 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:

Voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043 4866000

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 01-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*The function of BIM and MCL-1 deficiency in atherosclerosis development and the immune system*", is op de DEC vergadering van 25 februari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de titel op het voorblad en van het protocol in overeenstemming te brengen.
- Het ongerief (code 05) van de groepen 5, 6, 7 en 8 verzoekt de DEC te vermelden bij punt 10a.

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 **2011-034**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend.

Voorzitter DEC-UM

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-3

Referentie: 2011-034

Maastricht, 01-03-2011

Geachte leden van DEC-UM,

Naar aanleiding van uw schrijven van 1 maart jongstleden, doe ik u hierbij een herziene versie van het DEC protocol "*The function of BIM and MCL-1 deficiency in atherosclerosis development and on the immune system*" met bijbehorend DEC-nummer **2011-034** toekomen.

De DEC had naar aanleiding van het originele protocol enkele vragen en opmerkingen welke overwogen en aangepast zijn in de bijgesloten versie. Hieronder zullen de gestelde vragen kort beantwoord worden.

- * De titel vermeld op het voorblad is nu overgenomen op het protocol. De titel die gehanteerd is is dezelfde als hierboven vermeld.
- * Verder is voor studie 3 het ongerief zoals vermeld op het voorblad (code 05) overgenomen onder punt 10a. Hierbij is aangegeven dat de dieren in studie 3 een maximaal ongerief zullen ondervinden aan te merken als ernstig ongerief (=05) en de dieren in de overige studies zullen maximaal matig tot ernstig ongerief (=04) ondervinden.

De hierboven beschreven wijzigingen zijn in het DEC protocol verwerkt en zoals gevraagd met **GRIJS** aangeduid. Ik hoop u middels dit schrijven voldoende te hebben geïnformeerd en vertrouw erop dat uw vragen hiermee afdoende zijn beantwoord.

Met vriendelijke groet,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
07-04-2011

Project: The function of BIM and MCL-1 deficiency in atherosclerosis development and the immune system.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

¹
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
T (043)

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: 2011-034
Diersoort: muis
Aantal dieren: 218
Einddatum: 07-04-2015

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