

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM ⁸

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-031

Ontvangen: 01-03-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²
15-03-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
02-141

LVN/CBDNR ⁴

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	30982287M
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Regulatie van de immuunrespons door CD40L(CD154)-CD40-TRAF interacties tijdens hartfalen.

startdatum 1 Maart 2011

einddatum ⁹ 1 Maart 2015Duur van de proef¹⁰: 28 dagen

	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				Art. 12 Art. 9	
5. PI					

Diergroep	1	2	3	4			
ctrl/exp/sham	sham	exp					
Diersoort	01	01					
Stam	C57Bl/6J	C57Bl/6J					
Construct / mutatie ?	CD40L-/-, CD40-/-, CD40-TRAFwt, CD40-TRAF2/3/5, CD40-TRAF6, CD40-T2/3/5/6	CD40L-/-, CD40-/-, CD40-TRAFwt, CD40-TRAF2/3/5, CD40-TRAF6, CD40-T2/3/5/6					
Herkomst (leverancier) *	1	1					
Aantal	147	308					
Geslacht	M	M					
Dieren immuuncompetent ?	nee	nee					
Leeftijd/gewicht	8/12 weken	8/12 weken					
Doel van de proef *	31	31					
Belang van de proef *	1	1					
Toxicologisch onderzoek *	1	1					
Bijzondere technieken *	1	1					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	04	04					
Mate ongerief *	04	04					
Toestand dier einde exp*	1	1					

* VHL-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Regulatie van de immuunrespons door CD40L-CD40-TRAF interacties tijdens hartfalen.

1. Doel van de proef.

Hartfalen vormt een van de belangrijkste gezondheidsproblemen in de westerse wereld en zorgt voor een enorme druk op de gezondheidszorg wereldwijd. Ondanks medische interventies blijven de sterftecijfers voor deze ziekte hoog. De laatste 20 jaar is er steeds meer bewijs gekomen dat ontstekingsprocessen, inclusief infiltratie van leukocyten, een belangrijke rol spelen bij de ontwikkeling van hartfalen.

Het is bewezen dat de co-stimulatoire moleculen CD40L(CD154) en CD40 belangrijke regulatoren zijn van de immuunrespons tijdens verschillende ziektebeelden. Zo heeft recent onderzoek aangetoond dat de potente immuunmediator CD40 een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van atherosclerose. Het blokkeren van CD40-CD40L interacties in knock-out muizen resulteerde in een afname van atherosclerose[1]. Door anderen is aangetoond dat CD40L-CD40 interacties een rol spelen bij verschillende auto-immuunziekten.

De CD40 receptor heeft geen eigen signaaltransductie pathway en maakt daardoor gebruik van adaptor moleculen, de TNF Receptor Associated Factors (TRAFs). Het doel van deze proef is het bestuderen van de rol van het CD40L-CD40 co-receptor systeem en de TRAFs bij inflammatie tijdens hartfalen. Hierbij zal worden bekeken of muizen met een CD40 depletie een verminderde immuunrespons hebben en wat het effect hiervan is op hartfalen. Vervolgens zal er worden bekeken welke TRAFs hierbij betrokken zijn. Dit zal worden gedaan door gebruik te maken van CD40 knockout muizen, CD40L(CD154) knockout muizen en CD40 knockout muizen die zijn voorzien van een transgeen CD40 met een mutatie op de bindingsplaats van de verschillende TRAFs. Bij deze muizen zal hypertensie met als gevolg hartfalen worden geïnduceerd d.m.v. toediening van AngII.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Vanwege de hoge morbiditeit en mortaliteit vormt hartfalen een van de belangrijkste gezondheidsproblemen in de westerse wereld en het zorgt voor een enorme druk op de gezondheidszorg wereldwijd. Meer dan zeven miljoen Europeanen lijden aan hartfalen. Met dit onderzoek willen we de mechanismen bestuderen die zorgen voor beschadigingen van het hartweefsel tijdens hartfalen. Door in te grijpen in dit proces zou het mogelijk zijn de gevolgen van hartfalen te beperken en daarmee de kwaliteit van leven voor de patienten te verbeteren en de grote kosten voor de maatschappij te verminderen.

3. Alternatieven

Alternatieven, zoals celkweek experimenten, kunnen de werking van de hartspier niet voldoende nabootsen. Hierdoor zullen interacties tussen de verschillende celtypen van het hartweefsel en het immuunsysteem wegvallen. Er zijn (nog) geen in vitro modellen die deze complexe processen kunnen nabootsen. Daarnaast kan in de in-vitro modellen geen rekening gehouden worden met de synthese van verschillende cytokines en groeifactoren.

4. Ethische afweging

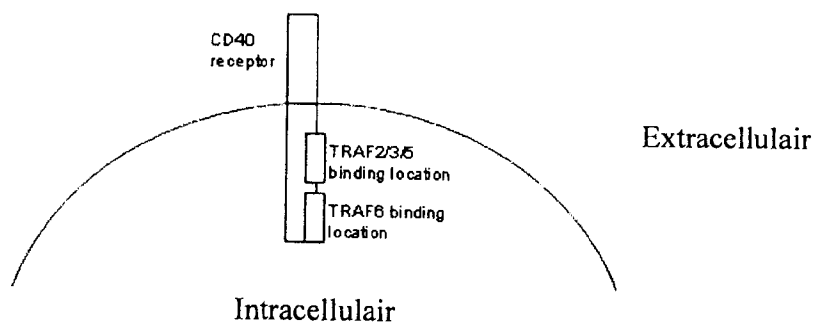
Het is reeds aangetoond dat remming van CD40L in staat is om atherosclerose in muizen te remmen. Daarom is het aannemelijk dat ook bij inflammatie tijdens hartfalen het blokkeren van de CD40L-CD40 interacties de ontwikkeling van hartfalen kan afremmen. Aangezien dit in de toekomst een

mogelijke therapie op kan leveren waarmee de gevolgen van hartfalen verminderd kunnen worden, weegt het ongerief van de dieren niet op tegen het maatschappelijk en wetenschappelijk gewin van dit onderzoek.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

CD40-CD40L interacties spelen een belangrijke rol in het immuunsysteem waarbij ze o.a. zorgen voor de activatie van T-lymfocyten. Ze hebben ook een aantal T-lymfocyt onafhankelijke functies in het initiëren en in stand houden van ontstekingsprocessen. Verder hebben CD40-CD40L interacties een belangrijke functie in de afbraak van extracellulaire matrix en lijken ze angiogenese te bevorderen. De CD40 receptor heeft geen eigen signaaltransductie en maakt daardoor gebruik van adaptor moleculen; de zogehete Tumor necrosis factor (TNF) Receptor-Associated Factors, ofwel TRAFs. De CD40 receptor heeft twee bindingsplaatsen voor deze TRAFs die worden geactiveerd na binding van CD40L, er is een bindingsplaats voor TRAF2/3/5 en er is een bindingsplaats voor TRAF6 (zie onderstaande figuur).



In het verleden is aangetoond dat remming van CD40L een vermindering geeft van de hoeveelheid atherosclerose en het aantal leukocyten in de plaques vermindert. Daarbij werd gevonden dat vooral de CD40-TRAF6 interacties een belangrijk pro-inflammatoir effect hebben [2].

Vervolgens zal er op verschillende tijdstippen worden gekeken naar de

functie van het hart (echocardiografie).

Na euthanasie zal het immuunsysteem in het bloed en de lymfoïde organen (milt en lymfklieren) worden geanalyseerd en zal het hartweefsel gebruikt worden voor immunohistochemie en moleculaire analyse. Tot slot zullen van elke conditie de cellen van meerdere hartjes in suspensie worden gebracht om de identiteit/eigenschappen van de infiltrerende immuunpopulaties te achterhalen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het project is beoordeeld en goedgekeurd door de PI van de vakgroep.

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Er wordt gewerkt met ko en transgene muizen met een C57Bl6 background. Het betreft: C57Bl6wt, CD40L-/-, CD40-/-, CD40-TRAFwt, CD40-TRAF2/3/5, CD40-TRAF6, CD40-T2/3/5/6 muizen. De muizen ontwikkelen hypertensive heart disease na inbengen van een pompje wat gedurende 7, danwel 28 dagen een constante hoeveelheid AngII afgeeft. De muizen zullen na het experiment opgeofferd worden zodat weefselmateriaal kan worden geanalyseerd.

7b. Sexe

De invloed van sexe-verschillen bij mannen en vrouwen op het ontstaan hartfalen zijn bekend, doch nog maar gedeeltelijk verklaard. Om eventuele hormonale invloeden uit te sluiten wordt dan ook uitsluitend gebruik gemaakt van mannetjes muizen.

7.c. Aantallen

In dit onderzoek wordt de bijdrage van ontstekingsprocessen aan de ontwikkeling van hartfalen onderzocht. De primaire uitkomstmaat na 4 weken angiotensine II behandeling is de gemeten hartfunctie, bepaald aan de hand van fractional shortening. De primaire uitkomstmaat na 1 week angiotensine II behandeling is de inflammatie, bepaald aan de hand van het percentage CD45⁺ cellen. De te verwachten variatie coëfficiënt van zowel fractional shortening als inflammatie bedraagt 20% en het te verwachten relatief effect is 20%.

Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$ dus gewenste P waarde is < 0.05 en power 80%.

$$\begin{aligned} \text{Dus } n &= 15,7 * (\sigma/\delta)^2 && \sigma \text{ (spreiding), } \delta \text{ (beoogd effect),} \\ N &= 15,7 * ((0,2 * 0,2)/(0,2 * 0,2)) && (0,2/0,2)^2 = 1 \\ &= 15,7 \text{ dieren} \end{aligned}$$

Angiotensine II-behandeling leidt tot een peri-operatieve en post-operatieve mortaliteit van ongeveer 15%. Indien 15.7 dieren 85% beslaan van de totale groep, hebben we $(15.7/85) * 100 = 18.47$ dieren, ofwel 19 dieren, nodig per groep.

In de sham groepen wensen wij hetzelfde aantal overlevende muizen. Saline-behandeling leidt tot een peri-operatieve mortaliteit van 10%, maar is niet geassocieerd met post-operatieve mortaliteit. Daarom zal elke sham-groep bestaan uit $(15.7/90) * 100 = 17.4$ dieren, ofwel 18 dieren.

diergroepen en experimentele condities.

Groep	Aantal dieren
1. C57Bl6Wt	18
2. C57Bl6Wt + AngII - 7 dagen	19
3. C57Bl6Wt + AngII - 28 dagen	19
4. CD40L-/-	18
5. CD40L-/- + AngII - 7 dagen	19
6. CD40L-/- + AngII - 28 dagen	19
7. CD40-/-	18
8. CD40-/- + AngII - 7 dagen	19
9. CD40-/- + AngII - 28 dagen	19
10. CD40-TRAFwt	18
11. CD40-TRAFwt + AngII - 7 dagen	19
12. CD40-TRAFwt + AngII - 28 dagen	19
13. CD40-TRAF2/3/5	18
14. CD40-TRAF2/3/5 + AngII - 7 dagen	19

15. <i>CD40-TRAF2/3/5 + AngII - 28 dagen</i>	19
16. <i>CD40-TRAF6</i>	18
17. <i>CD40-TRAF6 + AngII - 7 dagen</i>	19
18. <i>CD40-TRAF6 + AngII - 28 dagen</i>	19
19. <i>CD40-T2/3/5/6</i>	18
20. <i>CD40-T2/3/5/6 + AngII - 7 dagen</i>	19
21. <i>CD40-T2/3/5/6 + AngII - 28 dagen</i>	19
Totaal	392

Isolatie hartcellen voor analyse flow cytometer.

Van alle groepen zijn er drie extra dieren nodig om voldoende hartweefsel voor analyse met de flow cytometer te hebben.

Dat betekent $21 \times 3 = 63$ dieren.

6 Dierproef

8. Experiment

Flow chart

----- dag 0 -----	----- dag 7 -----
<i>Echocardio en minipompimplantatie</i>	<i>Echocardio Opofferen</i>
----- dag 0 -----	----- dag 28 -----
<i>Echocardio en minipompimplantatie</i>	<i>Echocardio Opofferen</i>

1. CD40(L)-/- muizen waarbij heart failure door hypertensive heart disease zal worden geïnduceerd dmv AngII

Angiotensine II infusie met subcutane minipomp zal gebeuren volgens : gedurende één en vier weken (zie flow chart). Uit ervaring weten we dat een dosis van 2.5 mg/kg/dag angiotensine II hoge bloeddruk, linker ventrikel hypertrofie en fibrose veroorzaakt in C57Bl/6J muizen. De verschillende groepen, condities en aantallen zijn aangeduid onder 7.c.

2. Materiaal voor flow cytometrische (FACS) analyse van hart geïnfiltreerde cellen.

Met behulp van immunohistochemie en qPCR is het slechts beperkt mogelijk om te bepalen tot welke immuunpopulaties de infiltrerende leukocyten behoren. Met behulp van de flow cytometer kunnen de percentages van verschillende leukocyten en hun eigenschappen worden bepaald, aan de hand van surface markers op de cellen kan bijvoorbeeld onderscheid worden gemaakt tussen T-lymphocyten en B-Lymphocyten. We zijn geïnteresseerd in de specifieke immuunpopulaties die infiltreren in het hart omdat we dan beter kunnen bepalen hoe het ingrijpen de immuunrespons in het hart moduleert. D.m.v. een speciale behandeling met enzymen (collagenase) kunnen alle cellen in het hart van elkaar worden losgemaakt, in suspensie worden gebracht en vervolgens ge-analyseerd met behulp van de flow cytometer (FACS). Van alle groepen worden hartjes genomen waaruit de cellen in suspensie worden gebracht voor analyse met de flow cytometer. Omdat de leukocyten waarin we geïnteresseerd zijn, slechts een klein percentage vormen van de totale cellen in het hart hebben we meerdere dieren nodig zodat celsuspensies uit 3 verschillende hartjes samengevoegd kunnen worden. Op deze manier is er voldoende celopbrengst om analyse met de flow cytometer mogelijk te maken. Er zullen gelijke aantallen van de shams en de AngII gebruikt worden.

Voor aantallen zie 7.c.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor minipomp implantatie en echocardiografie worden de muizen met 3-4 % isofluraan onder anaesthesie gebracht, waarna deze wordt onderhouden met 1.5-2.5 % isofluraan, zoals ook beschreven in . Voor de vergelijkbaarheid is het belangrijk dat de begin- en eindecho beide onder isofluraan-verdoving gebeuren.

9b. Pijnbestrijding

Pre-operatieve pijnbestrijding: Bij minipompimplantatie ontvangen de muizen eenmalig de NSAID carprofen **5 mg/kg** sc ter pijstilling. Bij uiteindelijke opoffering zal de muis onder volledige anesthesie gebracht worden met urethaan.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Dieren worden gedood d.m.v. een overdosis CO₂/O₂, waarna de gewenste organen worden uitgenomen.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

zwellen en ontsteking van de wond na minipompimplantatie, open wond met naar buiten komen van het pompje en zweren. Hartfalen ten gevolge van angiotensine-behandeling, gepaard met moeilijk ademen en apathie.

En bij ernstig ongerief zoals 'wasting syndrome' (gewichtsverlies, slecht onderhouden vacht, slecht eten, algemene zwakte), of onvoorziene infecties zal het desbetreffende dier worden afgemaakt.

10a. Ongerief



Alle muizen worden in groepsverband gehuisvest. De dieren worden in totaal 2 keer onder narcose gebracht; 1x voor minipomp implantatie en echocardiografie en 1x voor de eind-echocardiografie alvorens ze opgeoffererd worden. Ten gevolge van de angiotensine II behandeling kan de muis hartfalen ontwikkelen, met als symptomen moeilijk ademen en apathie (zie ook humane eindpunten).

	Ongerief narcose (dag 0)	Ongerief pomp implantatie (dag 0)	Ongerief narcose (eindmeting)	Totaal ongerief
Groep - sham	03	03	03	04
Groep - Ang II infusie	03	03	03	04

De muizen worden geëuthanaseerd d.m.v. een CO₂/O₂ mengsel. Het ongerief van de dieren die een operatie ondergaan (minipomp implantatie) en 2 keer onder narcose worden gebracht wordt als matig/ernstig (=04) ingeschat.

10b. Welzijnsevaluatie

Angiotensine II infusie heeft geen zichtbare invloed op het welzijn van muizen met deze genetische achtergrond. De verkoever kamer maakt dat de dieren niet veel energie aan het handhaven van een goede lichaamstemperatuur hoeven te besteden.

11. Verzorging en huisvesting

De verzorging en huisvesting vindt plaats in en conform de normen van de Centrale Proefdier Voorzieningen Maastricht. Bij calamiteiten de VO waarschuwen.

12. Deskundigheid

De minipomp implantatie wordt door de art. 12 functionaris gedaan, die uitgebreide ervaring heeft in het uitvoeren van deze procedure. De echocardiografie zal worden uitgevoerd door een bevoegd en bekwaam art. 9 functionaris.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Implantatie van Alzet osmotische minipompjes bij de muis:

Echocardiografie muis:

Flow Cytometer

- De muis wordt met pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) onder narcose gebracht.
- De muis wordt verbloed middels een orbitapunctie (>1 ml bloed nodig)
- Lymfklieren en milt worden zsm geïsoleerd en tot single cell suspensies gemaakt voor onmiddellijke FACS analyse.
- Hartweefsel word met een scheermesje in zeer kleine stukken gesneden en word opgelost m.b.v. collagenase II (1 mg/ml; en protease XIV (0.5 mg/ml;) in PBS for 7 min bij 37°C alvorens analyse met flow cytometer.

Relevante literatuur

1. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. Nat Med, 1999. 5(11): p. 1313-6.
2. Donners, M., et al., *The CD40-TRAF6 axis is the key regulator of the CD40/CD40L system in neointima formation and arterial remodeling*. Blood, 2008. 111(9): p. 4596.



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, 01-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Regulatie van de immuunrespons door CD40L(CD154)-CD40-TRAF interacties tijdens hartfalen*", is op de DEC vergadering van 25 februari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De art.14 functionaris verzoekt de verantwoordelijke onderzoeker in het werkprotocol de groepen op te splitsen per construct.
- De DEC verzoekt het budgetnummer in te vullen op het voorblad.
- Bij punt 7c merkt de DEC op dat de vermelding van "CD40 knockout groepen", niet juist is en verzoekt dit aan te passen.
- Bij punt 9b verzoekt de DEC de dosering van carprofen aan te passen in 5 mg/kg.

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 **2011-031**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Van:

Aan:
De Dier Experimentele Commissie,
Faculty of Health, Medicine and Life Sciences
Universiteit Maastricht

Betreft: Wijziging protocol 2011-031

Maastricht, 1 maart 2011

Geachte heer, mevrouw,

Bij dezen stuur ik u onze antwoorden op vragen van de DEC aangaande het onderzoeksvoorstel 2011-03, in de brief welke is bijgevoegd. Wij kunnen ons goed vinden in het commentaar en hebben deze in aanpassingen omgezet:

1. In het werkprotocol zullen de groepen worden opgesplitst per construct.
2. Het budgetnummer, 30982287M is ingevuld op het bijgevoegde voorblad
3. Bij punt 7c is de onjuiste vermelding van "CD40 knockout groepen" vervangen door "diergroepen en experimentele condities".
4. Bij punt 9b is de dosering van carprofen veranderd in 5 mg/kg.

Formatted: Bullets and
Numbering

De aangepaste versie van ons onderzoeksvoorstel is bijgevoegd met wijzigingen gemarkeerd in grijs.

Ik hoop u hiermee voldoende informatie te hebben verschaft. Bij onvolkomenheden of vragen kunt u vanzelfsprekend te allen tijde contact met mij opnemen.

Vriendelijke groet,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
17-03-2011

Project: Regulatie van de immuunrespons door CD40L(CD154)-CD40-TRAF interacties tijdens hartfalen.

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.

Bezoekadres

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

Projectnummer: 2011-031
Diersoort: muis
Aantal dieren: 455
Einddatum: 15-03-2015

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

U