

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-017

Ontvangen: 04-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-02-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
GGO 01-036

LNV/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	lov
----------------------	-----

Budgetnummer	31961946N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek: Pharmaceutische inhibitie van inflammasomes als methode om leverontsteking te inhiberen.

startdatum

07-02-2011

einddatum ⁹

31/12/2014

Duur van de proef¹⁰:

3 weken

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

Diergroep		Exp1 LDLR-/-
Ctrl/exp/sham		Exp
Diersoort		muis
Stam		C57Bl6
Construct / mutatie ?		LDLR-/-
Herkomst (leverancier) *		01
Aantal		33
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 *		01
Anesthesie *		01
Pijnbestrijding *		01
Mate ongerief *		04
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: Pharmaceutische inhibitie van inflammasomes als methode om leverontsteking te inhiberen.

1. Doel van de proef.

Doelstelling

Inzicht verkrijgen in het effect van inhibitie van inflammasome activatie op de ontwikkeling van leverontsteking, en op deze manier nieuwe targets identificeren voor mogelijke preventie en therapie van NASH.

Achtergrond

In de huidige Westerse samenleving is er sprake van een aanzienlijke stijging in het voorkomen van obesitas. Dit ziektebeeld gaat gepaard met de aanwezigheid van vetaccumulatie in de lever, waardoor steeds meer mensen leverontsteking ontwikkelen (Non alcoholic steatohepatitis, NASH). 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. Het exacte mechanisme hoe cholesterolopslag kan leiden tot leverontsteking is op dit moment nog niet gekend. Volgens ons speelt het proces van inflammasome activatie een belangrijke rol in de ontwikkeling van leverontsteking tijdens NASH.

Methoden

Dit project richt zich op de vraag via welk mechanisme lysosomaal cholesterol leverontsteking kan veroorzaken. Voor ons project gebruiken we een muismodel dat een verhoogde plasma cholesterol spiegel heeft, namelijk het hyperlipidemische model LDLR^{-/-}. Via toediening van een inhibitor van inflammasomes kunnen we kijken naar het effect van dit proces op de cholesterol stapeling in de Kupffer cellen en de bijdrage aan de ontwikkeling 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 vroege diagnostiek, preventie en mogelijke 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 ziekte 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 lipidenmetabolisme 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 proefdiermodellen te doen (zie punt 5). 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.

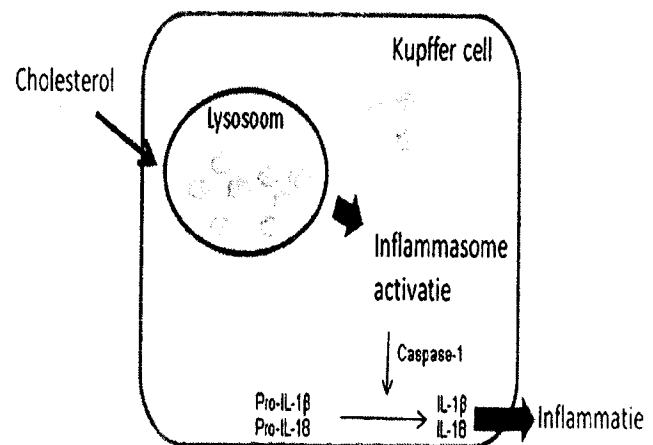
5. Wetenschappelijke onderbouwing

De hoge cholesterol waarden in het bloed zijn verantwoordelijk voor de opname van cholesterol in de 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.

Om de rol van deze schuimachtige Kupffercellen 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 niet aanwezig zijn op de beenmergcellen van hyperlipidemische muizen, leverinflammatie ook verminderd is. Echter de aanwezigheid van schuimachtige Kupffercellen is nog steeds aanwezig in deze muizen na de voeding van een vetrijk dieet. Verder onderzoek 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. Het precieze mechanisme hierachter is nog niet gekend. Daarom willen we tijdens deze proef inflammasome activatie onderzoeken, een proces waarvan is aangetoond dat lysosomale cholesterol stapeling er een invloed op heeft.

Activatie van zogenaamde **inflammasomen** zal leiden tot de vrijzetting van pro-inflammatoire cytokines en uiteindelijk inflammatie veroorzaken. Eerder onderzoek toonde aan dat een daling in autophagy kan leiden tot de activatie van deze inflammasomen doordat autophagy het proces van inflammasome activatie inhibeert (Saitoh et al. Nature 2008). Bovendien kan lysosomaal cholesterol stapeling de inflammasomen activeren via de formatie van cholesterolkristallen (Duell et al. Nature 2010). Onlangs stelden we de hypothese dat

lysosomale cholesterol stapeling kan leiden tot leverinflammatie door inflammasome activatie en inhibitie van autophagy (DEC 2010-188). Deze hypothese zullen we testen dmv een beenmergtransplantatie waardoor we beide processen specifiek moduleren. Een andere manier om inflammasome activatie te beïnvloeden is via een farmaceutisch middel: Pralnacasan. Dit pharmacon werkt als een Caspase-1 inhibitor waardoor de omzetting van pro-inflammatoire cytokines naar hun actieve vorm verhindert zal worden na inflammasome activatie (Stienstra et al., 2010, Cell Metabolism). Daarom luidt onze hypothese: **Pharmaceutische inhibitie van inflammasome activatie zal leiden tot een daling van leverontsteking tijdens de ontwikkeling van NASH.** Door het uitvoeren van deze studie krijgen we een beter inzicht via welk proces de lysosomale cholesterol stapeling in Kupffer cellen kan leiden tot leverontsteking in NASH.



Inflammasome activatie zal uiteindelijk leiden tot de omzetting van de inactieve cytokines Pro-IL-1 β en Pro-IL-18 tot hun actieve vorm IL-1 β en IL-18. Deze omzetting komt tot stand door de werking van **Caspase-1** en zal uiteindelijk leiden tot de vrijzetting van de proinflammatoire cytokines en op deze manier ontsteking veroorzaken. **Pralnacasan** is reeds eerder in andere studies aangetoond als Caspase-1 inhibitor. Door orale toediening van Pralnacasan willen we **de rol van inflammasome activatie achterhalen in de ontwikkeling van leverontsteking**. Ook willen we het effect van de **inhibitie bestuderen op het moment dat de muizen al een inflammatoire respons ontwikkeld hebben** (dit zal na 2 weken hoog vet dieet zijn). Op deze manier kunnen we achterhalen als **Pralnacasan** ook gebruikt kan worden als behandeling voor NASH.

6. Wetenschappelijke verantwoording

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

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Alle gebruikte diermodellen zijn muizen. De stam die gebruikt zal worden is de LDLR knock-out muis (Fok UM). Het gebruik is verduidelijkt onder punt 5. 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).

7.c. Aantallen

Experiment 1: Toediening Caspase-1 inhibitor

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.

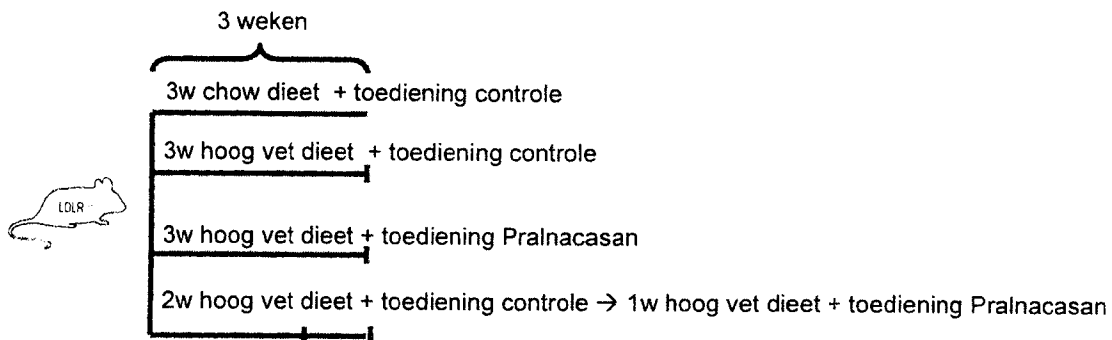
- LDLR-/- muizen, 3weken: chow dieet + toediening controle: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 3weken: hoog vet dieet + toediening controle: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 3weken: hoog vet dieet + toediening Pralnacasan: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 2weken: hoog vet dieet + toediening controle, laatste week: hoog vet dieet + toediening Pralnacasan: **11 muizen**

TOTAAL experiment 1:

44 LDLR-/- muizen

Dierproef

8. Experiment



Aan de muizen zal dagelijks via orale gavage een controleoplossing of Pralnacasan worden gegeven. Pralnacasan zal gegeven worden aan 100mg/kg lichaamsgewicht, opgelost in 0.1% carboxymethylcellulose → gebaseerd op Stienstra et al., 2010, Cell Metabolism.

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 te veel zouden lijden worden zij in overleg met het CPV personeel opgeofferd. Uiterlijke kenmerken waaraan aandacht dient te worden gegeven zijn: geen exploratief gedrag, niet eten of drinken, geen faeces productie, afname lichaamsgewicht met 20% tov begintijdpunt. Daarnaast dient er gelet te worden op mogelijke complicaties bij het toedienen via orale gavage zoals ademhalingsproblemen doordat vloeistof in de longen kan geraken. 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, O₂/CO₂ verstikking of pentobarbital toediening. Bij het gebruik van pentobarbital kan er op een gecontroleerde manier bij het beëindigen van het experiment een hartpunctie uitgevoerd worden voor het verzamelen van bloed. We verwachten hierbij geen invloed op de resultaten.

Zorg

10a. Ongerief

Alle muizen worden in groepsverband gehuisvest. Het milde dieet dat wordt toegediend aan de muizen maakt de dieren niet zichtbaar ziek, zeker niet aangezien het slechts om een korte periode gaat. Dit kan bijgevolg aanzien worden als gering ongerief (code 01). De bloedafname tijdens het experiment zal gebeuren voor de start van het dieet, halverwege en net voor de opoffering. Dit gebeurt via een staartvene punctie kan leiden tot een gering tot matig ongerief (code 02), aangezien de muis in een restrainer wordt gezet en dit zonder verdoving gebeurt. Aan alle dieren wordt er gedurende 3 weken dagelijks via orale gavage controle-oplossing of Caspase-1 inhibitor toegediend. Dit wordt als matig/ernstig gezien (code 04).

De opoffering wordt gedaan door toediening van pentobarbital natrium (150-200 mg/kg LG i.v.). Zo kan bij het opofferen van de muis nog een hartpunctie uitgevoerd worden voor bloedafname.

Het totale algemene ongerief tijdens dit experiment kan als matig tot ernstig worden beschouwd (code 04).

Experiment 1: Toediening van controle-oplossing of Caspase-1 inhibitor

Via orale toediening:

- hoog vet dieet voor 3 weken → code 01
- bloedafname via staartvene punctie voor en einde exp → code 02
- Dagelijkse orale toediening controle-oplossing of Caspase-1 inhibitor → code 04

Totaal: code 04

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere experimenten en bestaande literatuur zijn geen bijzonderheden te vermelden. Het toegediende dieet en pharmacon leidt niet tot zichtbare ziekteverschijnselen.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren worden sociaal gehuisvest. Standaard CPV. Huisvesting onder filtertopkooien gedurende het hele experiment

12. Deskundigheid

De uit te voeren experimenten zijn vergelijkbaar met vorige studies, uitgevoerd door VO en VVO. Binnen de groep ^a zijn er voldoende mensen die deskundig zijn in de orale toediening, het toedienen van injecties en afnemen van bloed.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Gekende samenstelling dieet:

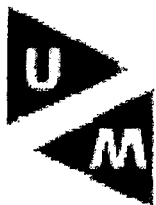
caseine 17% ; DL methionine 0.3% ; sucrose 34% ; zetmeel 14.5% ; cholesterol 0.2% ; cellulose 5% ; CM 205B (mineralen) 7% ; vit 200 1% ; boter 21%

Bloedafname:

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

Opofferen:

De opoffering gebeurt dmv cervicale dislocatie, O₂/CO₂ verstikking of pentobarbital natrium toediening (150-200 mg/kg LG i.v. of i.p.).



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 : f

Maastricht, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Pharmaceutische inhibitie van inflammasomes als methode om leverontsteking te inhiberen*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

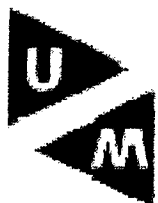
- * De DEC verzoekt de geplande startdatum op het voorblad aan te passen.
- * De DEC merkt op dat de controlegroep waarschijnlijk minder ongerief heeft en dient dus apart op het voorblad vermeld te worden.
- * Bij punt 6 verzoekt de DEC de laatste drie zinnen te verwijderen.
- * Bij punt 7c vraagt de DEC zich af wat er bedoeld wordt met 27-HC? De DEC vraagt zich tevens af bij punt 7c of het cursief gedrukte gedeelte, niet beter bij de wetenschappelijke onderbouwing vermeldt kan worden, het heeft namelijk niets met de aantallen te maken.

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 2010-017, 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, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Pharmaceutische inhibitie van inflammasomes als methode om leverontsteking te inhiberen*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de geplande startdatum op het voorblad aan te passen. De datum werd aangepast.

- De DEC merkt op dat de controlegroep waarschijnlijk minder ongerief heeft en dient dus apart op het voorblad vermeld te worden.

De groep staat nu apart vermeld op het voorblad als controlegroep. De mate van ongerief heeft code 04 door het dagelijks toedienen van een controleoplossing via orale gavage.

- Bij punt 6 verzoekt de DEC de laatste drie zinnen te verwijderen. Dit werd aangepast.

- Bij punt 7c vraagt de DEC zich af wat er bedoeld wordt met 27-HC? De DEC vraagt zich tevens af bij punt 7c of het cursief gedrukte gedeelte, niet beter bij de wetenschappelijke onderbouwing vermeldt kan worden, het heeft namelijk niets met de aantallen te maken.

Dit was een fout en moet Pralnacasan zijn, zoals aangepast. Verder staat de cursief gedrukte tekst nu in de wetenschappelijke onderbouwing zodat onder punt 7c nu enkel de berekening van de aantallen staat.

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 2010-017, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
08-02-2011

Project: Pharmaceutische inhibitie van inflammasomes als methode om leverontsteking te inhiberen.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM
T

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: 2011-017

Diersoort: muis

Aantal dieren: 44

Einddatum: 07-02-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM