

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-087

Ontvangen: 18-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
19-07-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	GARIM	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	30973520N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

In vitro evaluatie van het effect van asfyctische preconditionering op de immuunrespons van astroglia, microglia en oligodendrocyten

startdatum **Juli 2011**

einddatum ⁹ **September 2012**

Duur van de proef¹⁰:

1 dag

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

Diergroep	1
ctrl/exp/sham	controle
Diersoort	02
Stam	Sprague Dawley
Construct / mutatie ?	/
Herkomst (leverancier) *	01
Aantal	36
Geslacht	m/v
Dieren immuuncompetent ?	ja
Leeftijd/gewicht	P1
Doel van de proef *	32
Belang van de proef *	01
Toxicologisch onderzoek *	01
Bijzondere technieken *	01
Anesthesie *	01
Pijnbestrijding *	01
Mate ongerief *	02
Toestand dier einde exp*	01

* VHI-coderingen zie bijlage

Verantwoording

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

Titel: *In vitro* evaluatie van het effect van asfyctische preconditionering op de immuunrespons van astroglia, microglia en oligodendrocyten.

1. Doel van de proef.

Perinatale asfyxie, gedefinieerd als een beperkte zuurstoftoevoer naar de foetus of het pasgeboren kind, is één van de belangrijkste oorzaken van neuronale schade en ontwikkelingsachterstand bij kinderen. Momenteel is er nog geen farmacologische behandeling beschikbaar om de levenskwaliteit van kinderen met post-asfyctische hersenschade te verbeteren.

Recent hebben we in onze onderzoeksgroep aangetoond dat een korte periode van foetale asfyxie kan leiden tot neuroprotectie tegen een daaropvolgend zwaarder perinataal insult. Dit fenomeen, dat asfyctische preconditionering wordt genoemd, is een veelbelovende benadering voor verder onderzoek. Het beter begrijpen van de onderliggende mechanismen van preconditionering zou mogelijk kunnen leiden tot de identificatie van nieuwe behandelingswijzen.

In dit onderzoek willen we gaan kijken naar de effecten van asfyctische preconditionering op de immuunrespons van astroglia, microglia en oligodendrocyten. Mogelijk kan preconditionering neuro-inflammatie tegengaan via de activatie van anti-inflammatoire mechanismen. Welke pro- en anti-inflammatoire mechanismen er precies betrokken zijn in asfyxie en preconditionering zijn nog niet achterhaald en willen wij met behulp van een *in vitro* model evalueren.

Het primaire doel van deze proef is een *in vitro* model voor asfyxie op te stellen opdat we in de toekomst minder gebruik zullen moeten maken van *in vivo* modellen om zo het aantal proefdieren te minimaliseren.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

De prevalentie van foetale en perinatale asfyxie is zeer hoog, ongeveer 25 op 1000 geboorten. Enkel voor Nederland bedraagt dit al ongeveer 4225 pasgeborenen per jaar. Beide vormen kunnen leiden tot zowel zware structurele hersenschade als een grote ontwikkelingsachterstand. Tot op heden bestaat er nog geen effectieve farmacologische therapie om de levenskwaliteit van asfyctische kinderen te verbeteren. Recent is aangetoond dat een milde vorm van asfyxie (preconditioning) kan beschermen tegen een daaropvolgend ernstig insult. Bijgevolg is het bestuderen van de mechanismen die betrokken zijn in het preconditioneringproces van extreem groot belang en mogelijk zou dit kunnen leiden tot het identificeren van nieuwe behandelingswijzen.

Met behulp van een *in vitro* model voor preconditionering kunnen op een snelle manier verschillende therapeutische toepassingen getest worden.

3. Alternatieven

Aangezien we willen kijken naar het effect van zuurstofgebrek op de immunrespons van astroglia, microglia en oligodendrocyten, is *in vitro* onderzoek noodzakelijk. De cellen nodig voor dit onderzoek zullen worden verkregen uit ratten omdat we voor hetzelfde onderzoek ook een *in vivo* model in ratten hebben lopen. Op deze manier kunnen we de *in vitro* en *in vivo* resultaten effectief met elkaar vergelijken. We hopen de resultaten verkregen uit het *in vitro* onderzoek te kunnen valideren met de resultaten uit *in vivo* onderzoek zodat we uiteindelijk uitsluitend met *in vitro* modellen kunnen verder werken om het aantal proefdieren tot een minimum te beperken.

4. Ethische afweging

We zijn er van overtuigd dat het belang van dit onderzoek opweegt tegen het lijden van de dieren. Immers, de exacte mechanismen die betrokken zijn in asfyxie en preconditionering zijn op heden nog niet bekend. Aangezien de prevalentie van perinatale asfyxie erg hoog is en er nog geen effectieve behandeling beschikbaar is om het lot van deze patiënten te verbeteren, is het van groot belang om de onderliggende mechanismen van asfyxie versus preconditionering te ontcijferen om

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Recente data tonen dat een milde asfyctische blootstelling bescherming biedt tegen een daaropvolgende schadelijke asfyctische aandoening. Dit fenomeen, dat asfyctische preconditionering wordt genoemd, is reeds in verschillende organen zoals het hart en de hersenen beschreven [1, 2].

De onderliggende mechanismen die deze functionele bescherming veroorzaken zijn echter nog niet bekend. Tijdens dit project willen we kijken hoe we deze bescherming kunnen verklaren. In het bijzonder zullen we kijken naar de veranderingen in microglia, astroglia en oligodendrocyten, de belangrijkste immuuncellen van het brein.

Ten gevolge van de neuronale schade die asfyxie met zich meebrengt, worden er moleculaire signalen afgegeven die zorgen voor activatie van microglia. Deze microglia zullen op hun beurt ook moleculaire signalen afgeven (waaronder neurotoxische en pro-inflammatoire cytokines) waardoor astroglia geactiveerd worden. De geproduceerde cytokines zorgen er dan weer voor dat microglia en astroglia op een autocriene manier geactiveerd worden. Dit volledige proces zorgt ervoor dat er een continue cascade ontstaat waarbij het weefsel nog meer beschadigd wordt [3].

Ons project zal zich richten op de hypothese dat preconditionering leidt tot veranderingen in de inflammatoire respons, die pasgeborenen beschermen tegen een daaropvolgende ernstige perinatale asfyxie. Hierbij willen we onderzoeken of foetale asfyxie de post-asfyctische inflammatoire respons van de perinatale asfyctische insult kan veranderen of zelfs voorkomen.

Om dit te onderzoeken zullen we gebruik maken van *in vitro* celculturen. Hierbij zullen we kijken naar het effect van asfyxie en preconditionering op

- de morfologie van astroglia, microglia en oligodendrocyten
- de expressie van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines (IL1 β , IL6, IL10, TNF α , ...)
- de expressie van moleculen die een rol spelen in het immuunsysteem (TLRs, ceramides, ...)

Indien we een verandering zien in een specifiek molecuul, kunnen we in volgende experimenten ook gaan onderzoeken of het exogeen toevoegen of verwijderen van de component kan bijdragen aan neuronale protectie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Beoordeling en goedkeuring:

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

We willen primaire celculturen kweken uit ratten met leeftijd P1. Deze zouden afkomstig moeten zijn van Sprague-Dawley ratten afkomstig van Charles River aangezien we in deze soort onze *in vivo* studies hebben gedaan [4, 5]. De pups mogen komen uit breeding protocols en die voor geen andere doeleinden gebruikt worden. De pups zullen worden geofferd via decapitatie.

7b. Sexe

Beide geslachten kunnen gebruikt worden om de celculturen te verkrijgen.

7c. Aantallen

Uit ervaring weten we dat er ongeveer 3 pups nodig zijn om voldoende microglia te verkrijgen voor één 6-wells plaat. Astroglia kunnen uit dezelfde pups verkregen worden opdat we een minimaal aantal dieren kunnen gebruiken. Voor oligodendrocyten hebben we 6 pups nodig voor een 6-wells-plaat.

We willen 4 condities testen:

- controle,
- 30 minuten zuurstof- en glucosedepprivatie,
- 3 uur zuurstof- en glucosedepprivatie,
- Combinatie 30 min + 3u zuurstof- en glucosedepprivatie.

Bijgevolg hebben we één 6-wells-plaat per conditie nodig. Per plaat kunnen we dan de 3 voorafgestelde doeleinden in duplo toepassen:

- de morfologie van de verkregen cellen
- de expressie van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines (IL1 β , IL6, IL10, TNF α , ...)
- de expressie van moleculen die een rol spelen in het immuunsysteem (TLRs, ceramides, ...)

In totaal hebben we dus 4 6-wells-platen nodig per celcultuur.

Voor het aantal pups betekent dit:

- Microglia en astroglia: 3 pups / plaat x 4 platen $\rightarrow$ 12 pups
- Oligodendrocyten: 6 pups / plaat x 4 platen $\rightarrow$ 24 pups
- DUS totaal aantal van 36 pups

Dierproef

8. Experiment

Zie ook bijlage 1 en 2

Graag willen we pups uit breeding protocollen gebruiken die voor geen andere doeleinden nodig zijn. De pups zullen gebruikt worden voor het aanleggen van microglia-, astroglia- en oligodendrocyt-celkweken. Deze celkweken worden blootgesteld aan 4 verschillende condities:

- controle (normale zuurstof- en glucose-blootstelling),
- 30 minuten zuurstof- en glucosedepprivatie,
- 3 uur zuurstof- en glucosedepprivatie,
- Combinatie 30 min + 3u zuurstof- en glucosedepprivatie.

Als uitleesparameters zullen we gebruik maken van histologie en qPCR om te kijken naar:

- de morfologie van de verkregen celculturen
- de expressie van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines (IL1 β , IL6, IL10, TNF α , ...)

- de expressie van moleculen die een rol spelen in het immuunsysteem (TLRs, ceramides, ...)

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er zal geen anesthesie worden toegepast, aangezien het anestheticum kan interfereren met de uitleesparameters van het onderzoek (Bette, M., et al., Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rat spleen. *Lab Anim*, 2004. **38**(3): p. 272-9.).

9b. Pijnbestrijding

Er zal geen pijnbestrijding worden toegepast.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie

- Decapitatie van pups

Humane eindpunten

- De pups zullen weinig leed ondervinden daar ze gedecapiteerd worden en de breintjes zullen postmortem verwijderd worden.

Zorg

10a. Ongerief

- Pups: Via decapitatie zullen de pups worden opgeofferd (matig ongerief; ongeriefcode 02).

10b. Welzijnsevaluatie

Er worden geen problemen verwacht.

11. Verzorging en huisvesting

De moederdieren waarvan we de pups willen gebruiken kunnen onder standaard condities worden gehuisvest in het CPV van de UM, met vrije toegang tot water en voer en een 12u dag/nacht ritme.

12. Deskundigheid

De ingrepen zullen worden verricht door personeel die Art. 9 bevoegd zijn.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage 1 en 2

Relevante literatuur

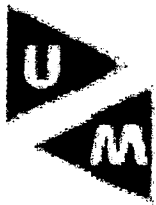
1. Cai, Z., J.D. Fratkin, and P.G. Rhodes, *Prenatal ischemia reduces neuronal injury caused by neonatal hypoxia-ischemia in rats. Neuroreport*, 1997. **8**(6): p. 1393-8.
2. Rubino, A. and D.M. Yellon, *Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart? Trends Pharmacol Sci*, 2000. **21**(6): p. 225-30.
3. Kaminska, B., K. Gaweda-Walerych, and M. Zawadzka, *Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants--facts and hypotheses. J Cell Mol Med*, 2004. **8**(1): p. 45-58.
4. Strackx, E., et al., *Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced behavioral consequences in adulthood. Behavioral brain research*, 2009. **Accepted**.
5. Strackx, E., et al., *Alterations of brain apoptotic cell death and carotid artery reactivity in a fetal asphyxia preconditioning model. Front Bioscience*, 2009. **Accepted**.
6. Kanto, J., et al., *Placental transfer and maternal midazolam kinetics. Clin Pharmacol Ther*, 1983. **33**(6): p. 786-91.
7. Bette, M., et al., *Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rat spleen. Lab Anim*, 2004. **38**(3): p. 272-9.
8. Hamaya, Y., et al., *The effects of pentobarbital, isoflurane, and propofol on immediate-early gene expression in the vital organs of the rat. Anesth Analg*, 2000. **90**(5): p. 1177-83.

Bijlage 1: Verkrijgen van astroglia en microglia celculturen

- Decapitatie van P1 pups
- Dissectie van cerebrale cortex van rattenpups + incubatie in 7.5 mL Ca²⁺- and Mg²⁺-vrij Hanks' balanced saline oplossing (Life Technologies) met 0.2% trypsin
- Homogenisatie met een 5 mL pipet (15-20 keer op en neer) gevolgd door homogenisatie met een Pasteur pipet (15-20 op en neer) (=Trituration)
- Centrifugeer op 1200 rpm gedurende 5 minuten
- Verwijder het supernatant en voeg 5 ml astro-medium toe
- Homogeniseer via een Pasteur pipet (diameter 2 keer kleiner maken) (15-20 keer op en neer)
- Voeg een groter volume astro-medium toe (= afhankelijk van de hoeveelheid cortex die je hebt, meestal 10 ml cel suspensie per 175cm² flasks)
- Homogeniseer de cel suspensie door een 70 micron-pore filter
- Breng de cellen over in culture flasks: gebruik 175cm² flask, 1 cortex/flask, 10 ml van de gefiltreerde cel suspensie + 30 ml astro-medium.
- Laat de cellen groeien in de incubator (37°C and 5% CO₂) gedurende 4 dagen zonder het medium te verversen
- Aspireer het cultuur medium volledig en voeg nieuw cultuur medium toe (+/- 16 ml)
- Laat de cellen nog eens gedurende 5 dagen groeien
- Start de shaking procedure:
 - * 6 uur shaken op 200 rpm
 - * Verzamel het supernatans (welke de microglia bevat) en was met PBS om de half-aangehechte cellen te verwijderen. Voeg vervolgens nieuw cultuur medium toe en laat nog 18u shaken
 - In totaal 24u shaken
- Centrifugeer het supernatans/microglia suspensie op 1200 rpm gedurende 5 min
- Verwijder het resulterende supernatans en voeg vers medium toe aan het pellet (afhankelijk van de grootte van het pellet: tussen 1-2 ml)
- Tel de cellen: trypan blue kleuring en telkamer
- Plaat 250-300K cellen per well van een 6-wells plate (meestal zijn er 3 cortexen nodig per 6-well plate)
- Behandel de microglia de volgende dag

Bijlage 2: Verkrijgen van oligodendrocyt celculturen

- Decapitatie van P1 pups
- Dissectie van cerebrale cortex van rattenpups + incubatie in 7.5 mL Ca²⁺- and Mg²⁺-vrij Hanks' balanced saline oplossing (Life Technologies) met 0.2% trypsin
- Homogenisatie met een 5 mL pipet (15-20 keer op en neer) gevolgd door homogenisatie met een Pasteur pipet (15-20 op en neer) (=Trituration)
- Cellen worden verkregen met behulp van MACS cell separation.



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, 29-06-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*In vitro* evaluatie van het effect van asfyctische preconditionering op de immuunrespons van astroglia, microglia en oligodendrocyten", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- Bij punt 2 merkt de DEC op dat dit meer fundamenteel onderzoek is en niet direct klinisch van belang is. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC verzoekt de code voor bijzondere technieken op het voorblad aan te passen in code 01 en het ongerief in code 02 (dit dient ook aanpast te worden bij punt 10a).
- Bij punt 9a wenst de DEC een onderbouwing waarom of er geen anesthesie wordt gebruikt.

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 **2011-087**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Beste,

Naar aanleiding van de vragen en opmerkingen van de DEC, onderstaande antwoorden:

- Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Zowel op het voorblad als in punt 10a is de ongeriefcode aangepast naar 02, opdat het ook overeenstemt met opmerking 3 van de DEC.

- Bij punt 2 merkt de DEC op dat dit meer fundamenteel onderzoek is en niet direct klinisch van belang is. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Alhoewel het onderzoek op dit moment nog fundamenteel is, zijn we er van overtuigd dat het een klinisch relevante toepassing kent. In punt 2 hebben we dit echter aangepast om aan de opmerking van de DEC tegemoet te komen.

- De DEC verzoekt de code voor bijzondere technieken op het voorblad aan te passen in code 01 en het ongerief in code 02 (dit dient ook aanpast te worden bij punt 10a).

Zowel op het voorblad alsook in punt 10a, betreffende de ongeriefcode, zijn de codes aangepast.

- Bij punt 9a wenst de DEC een onderbouwing waarom of er geen anesthesie wordt gebruikt.

Aangezien de pups weinig ongerief ondervinden van de decapitatie, achten wij het onnodig anesthesie toe te passen. Dit zou immers onnodig extra ongerief voor de pups met zich meebrengen. Verder kan het anestheticum ook interfereren met de uitleesparameters van het onderzoek (zie DEC voorstel).

Met vriendelijke groet,

Aan.

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
22-07-2011

Project: *In vitro* evaluatie van het effect van asfyctische preconditionering op de immuunrespons van astroglia, microglia en oligodendrocyten.

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
T (043

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-087
Diersoort: rat
Aantal dieren: 36
Einddatum: 19-07-2015

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