

131

1

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie**DECNR: 2011-063****Ontvangen: 03-05-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
25-05-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander-UM	Geen-UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

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

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

Budgetnummer	30983239N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Inhibition of CD40L-CD40-**interactions as therapeutic target in inflammatory disease**

startdatum 01/05/2011

einddatum ⁹ 01/05/2014Duur van de proef¹⁰: 108 uur

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

* ontheffing van de verboden zoals gesteld in art. 9 van de WOD, verkregen van de minister van LNV, d.d. 12-01-2010. Brief aanwezig op het secretariaat CPV.

Diergroep	1 Exp I	2 Exp I	3 Exp I		4 Exp II Ontv	5 Exp II Ontv
Crtl/exp/sham	Control	SHAM	Exp		SHAM	Exp
Diersoort	01	01	01		01	01
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6		C57Bl6	C57Bl6
Construct/mutatie	-	-	-		-	-
Herkomst	01	01	01		01	01
Aantal	8	8	40		8	40
Geslacht	M/V	M/V	M/V		M/V	M/V
Dieren immuuncompetent	Ja	Ja	Ja		Ja	Ja
Leeftijd (wkn) /gewicht (g)	5-8/ 20-30	5-8/ 20-30	5-8/ 20-30		5-8/ 20-30	5-8/ 20-30
Doel van de proef	31	31	31		31	31
Belang van de proef	01	01	01		01	01
Toxicologisch onderzoek	01	01	01		01	01
Bijzondere technieken	12	12	12		12	12
Anesthesie	01	01	01		01	01
Pijnbestrijding	04	04	04		04	04
Mate ongerief	02	04	04		04	04
Toestand dier einde exp.	01	01	01		01	01

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Inhibition of CD40L-CD40-
disease

interactions as therapeutic target in inflammatory

1. Doel van de proef.

Atherosclerose is een chronische ontstekingsziekte van de bloedvatwand welke uiteindelijk kan leiden tot een hart- of herseninfarct. CD40L, CD40 en zijn eiwitten die een belangrijke rol spelen in de ontstekingsreactie die ten grondslag ligt aan atherosclerose. CD40L-CD40- spelen tevens een rol in het ontstaan van vele andere ontstekingsziekten, zoals reumatoïde artritis, colitis ulcerosa, transplantaat afstoting, experimentele encephalitis, peritonitis en anderen. In deze studie willen we onderzoeken of in vivo inhibitie van CD40L-CD40 interacties ontsteking vermindert. Dit willen we onderzoeken in een diermodel voor acute ontsteking (peritonitis muismodel).

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Ontstekingsziekten veroorzaken veel morbiditeit en mortaliteit, zo is alleen al atherosclerose verantwoordelijk voor 50% van de sterfgevallen in de Westerse wereld. In het voorgestelde project willen we onderzoeken hoe in vivo remming van het CD40-CD40L- systeem ontsteking beïnvloed. Uiteindelijk geeft dit project meer inzicht in het ontstaan van ontstekingsziekten, waardoor we nieuwe therapeutische targets kunnen identificeren.

3. Alternatieven

De compounds die we willen gebruiken om CD40-CD40L- interacties te remmen zijn uitvoerig in cellijnen getest. Het ontstaan van ontsteking is echter een erg complex proces dat afhankelijk is van de functie van interacterende cellen, cytokines, chemokines, mechanische factoren, etc. Dit kan onvoldoende worden nagebootst in louter in-vitro technieken, zoals cel- of weefselkweek. Het gebruik van proefdieren is daarom onvermijdelijk.

4. Ethische afweging

Omdat de voorgestelde studie uiteindelijk kan leiden tot meer inzichten in het ontstaan van ontstekingsziekten, en derhalve kan leiden tot de identificatie van nieuwe therapeutische interventies, weegt het maatschappelijk gewin zwaarder dan het ongerief van de dieren.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Atherosclerose is een chronische ontstekingsziekte van de bloedvatwand die uiteindelijk kan leiden tot een hart- of herseninfarct. CD40L is een eiwit dat een belangrijke rol speelt in de ontstekingsreactie die ten grondslag ligt aan atherosclerose. Binding van CD40L aan zijn receptor, CD40, resulteert in activatie van ontstekingscellen en het vrijkomen van chemokines en cytokines die de ontsteking doen toenemen. Interacties tussen CD40L en CD40 dragen dan ook bij aan het ontstaan van atherosclerose (*Seijkens et al. Seminars in Immunol, 2009*). Remming van CD40L-CD40 interacties door antilichamen resulteert dan ook in de vorming van kleine atherosclerotische plaques met een stabiel fenotype (veel gladde spiercellen en weinig ontstekingscellen), waardoor de kans op klinische complicaties kleiner is (*Lutgens et al. Nature Med., 1999, Lutgens et al, PNAS, 2000*).

Naast een belangrijke rol in het ontstaan van atherosclerose dragen CD40L-CD40 interacties ook bij aan het ontstaan van andere ontstekingsziekten, zoals reumatoïde arthritis, colitis ulcerosa, transplantaat afstoting en experimentele encephalitis. Omdat de eiwitten bijdragen aan de pathogenese van deze ziekten is ook uitvoerig onderzocht of remming van CD40L een gunstig effect heeft op het beloop van deze aandoeningen. Uit deze studies is gebleken dat remming van CD40L door middel van antilichamen inderdaad resulteert in verminderde ziekteactiviteit (*Seijkens et al. Throm. Haemos. 2010*). Remming van CD40L-CD40 interacties zou dus een therapeutisch target kunnen worden. Remming van CD40L leidt echter ook tot het ontstaan van trombo-embolien omdat bloedstolsels minder gestabiliseerd zijn. Algemene remming van CD40L is daarom niet haalbaar in de klinische praktijk.

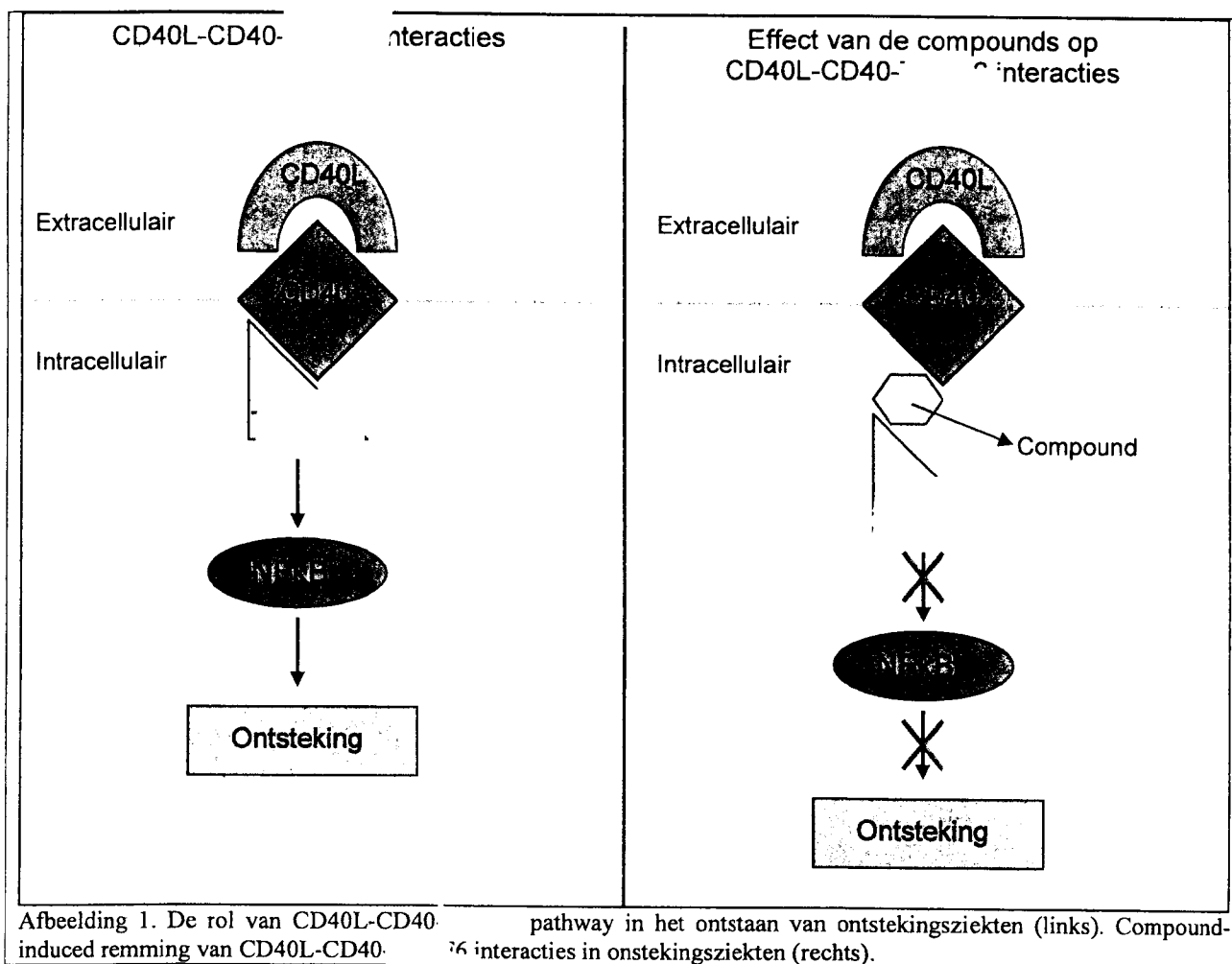
In vervolgstudies hebben wij daarom onderzocht welke intracellulaire signaalmoleculen betrokken zijn bij CD40L-CD40 interacties. Uit deze studie bleek dat CD40L binding resulteert in activatie van het eiwit $\text{NF-}\kappa\text{B}$ via CD40. Vervolgens hebben we aangetoond dat CD40L-CD40 interacties bijdragen aan het ontstaan van atherosclerose. En remming van deze interactie resulteert in minder atherosclerose, terwijl de bloedstolling niet beïnvloed wordt. Remming van deze interactie zou dus een therapeutisch target voor ontstekingsziekten kunnen (*Lutgens et al. JEM, 2010*).

In samenwerking met de afdeling Biochemie hebben we vervolgens compounds (kleine moleculen) ontwikkeld die specifiek de interactie tussen CD40 en $\text{NF-}\kappa\text{B}$ blokkeren (zie afbeelding). De effectiviteit van de compounds is in vitro geanalyseerd. Op basis van dit onderzoek hebben we 10 compounds geselecteerd die ontsteking in vitro remmen.

In het voorgestelde project willen onderzoeken of de compounds ook in vivo ontsteking kunnen remmen. We willen de 5 compounds allereerst in een kortdurend model voor acute ontsteking (peritonitis model) testen (deze projectaanvraag). In een later stadium willen we de compounds in een model voor chronische inflammatie (muis atherosclerose model) evalueren.

De compounds die we nu in vivo willen testen zijn ontworpen op basis van non-toxiciteit. Verder hebben drie in vitro analysis aangetoond dat de compounds niet toxisch zijn.

Dit project zal ons meer inzicht geven in het proces dat ten grondslag ligt aan ontstekingsziekten, zoals reuma, colitis, atherosclerose en anderen, waardoor het mogelijk kan worden nieuwe therapeutische targets te identificeren.



6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is gelezen en akkoord bevonden door:

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort, stam: C57Bl6 muizen

Herkomst: de muizen zijn afkomstig van een geregistreerd fokbedrijf.

Eindbestemming: de dieren worden opgeofferd in het kader van het experiment.

7b. Sexe

Voor de experimenten willen we gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijk muizen.

7c. Aantallen

Het projectvoorstel bestaat uit 2 experimenten (punt 8). Groepen per experiment:

1. 1 controle groep (geen inductie peritonitis),
2. 1 SHAM groep (geen compound injectie, wel inductie peritonitis)
3. 5 testgroepen (we willen 5 compounds in vivo testen).

Dus in totaal 7 groepen per experiment. Echter, gezien het korte tijdverschil tussen het vroege en late experiment zal voor beide experimenten dezelfde controlegroep gebruikt worden.

Op basis van de literatuur (bijvoorbeeld Kanters et al. JCI, 2003) schatten we de gemiddelde $\sigma = 35$ en $\delta = 50$ (opbrengst peritoneale cellen als parameter). Volgens de formule van L. Sachs met een betrouwbaarheid van 80% volgt: $F_{0,80} = 15,7 \rightarrow n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 \rightarrow n = 15,7 * (35/50)^2 \rightarrow n = 7,69 \rightarrow n = 8$ per groep

Totaal aantal dieren: $1 \times 7 \times 8 + 1 \times 6 \times 8 = 104$ muizen

7 Dierproef

8. Experiment

Experiment I:

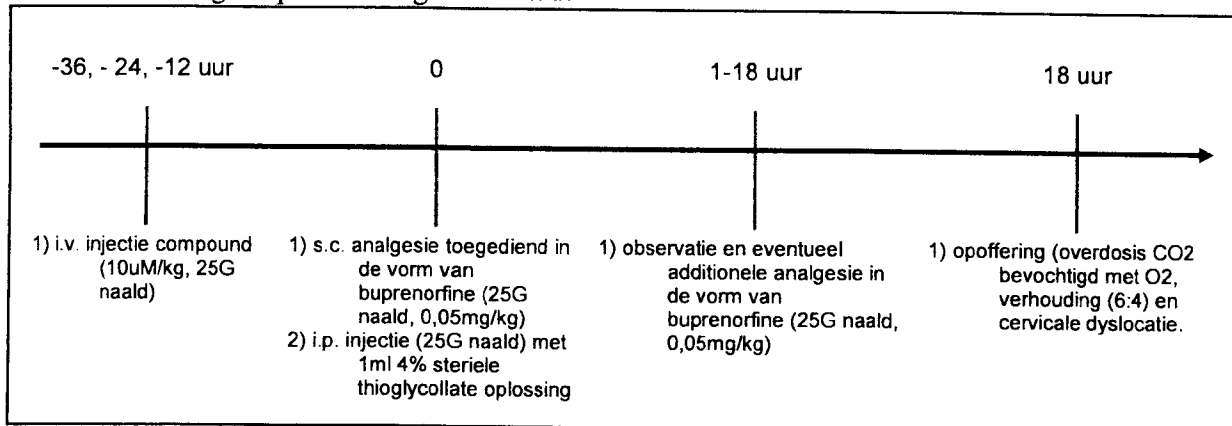
Doel

In dit experiment willen we onderzoeken wat het effect van de compounds is op de vroege fase van een ontstekingsreactie. Het betreft dan met name de rol van granulocyten en monocytten.

Set-up (afbeelding 2)

1. De compounds zullen intraveneus worden toegediend op tijdstip -36 uur, -24 uur en - 12 uur voor de inductie van de peritonitis om zo een stabiele plasmaconcentratie te bereiken. De streefconcentratie is 10 uM (op basis van het molgewicht en het gewicht van de muis zal de dosering worden berekend). Gegevens over de farmacokinetiek en farmacodynamiek van de compounds zijn op dit moment van de studie niet bekend. Zodra we de effectiviteit in vivo hebben onderzocht, zullen we de meeste effectieve compounds selecteren en hiervan de farmacokinetiek en farmacodynamiek onderzoeken.
2. Pijnstilling: buprenorfine, 0.05mg/kg, s.c.
3. 30 minuten wachten (inwerktijd pijnstilling)
4. Inductie peritonitis: thioglycollaat, 4% oplossing in 0.9% NaCl, 1 ml.
5. Opoffering: 18 uur na inductie van de peritonitis zullen de muizen worden opgeofferd (overdosis CO₂ bevochtigd met O₂, verhouding (6:4) en cervicale dyslocatie).
6. Isolatie van peritoneale cellen, bloed, milt, beenmerg.

De controlegroep zal geïnjecteerd worden met 1 ml 0.9% NaCl oplossing i.p.v. de compounds. Voorts wordt er geen peritonitis geïnduceerd.



Afbeelding 2: Flowchart voor de muizen in experiment I.

Experiment II:

Doel

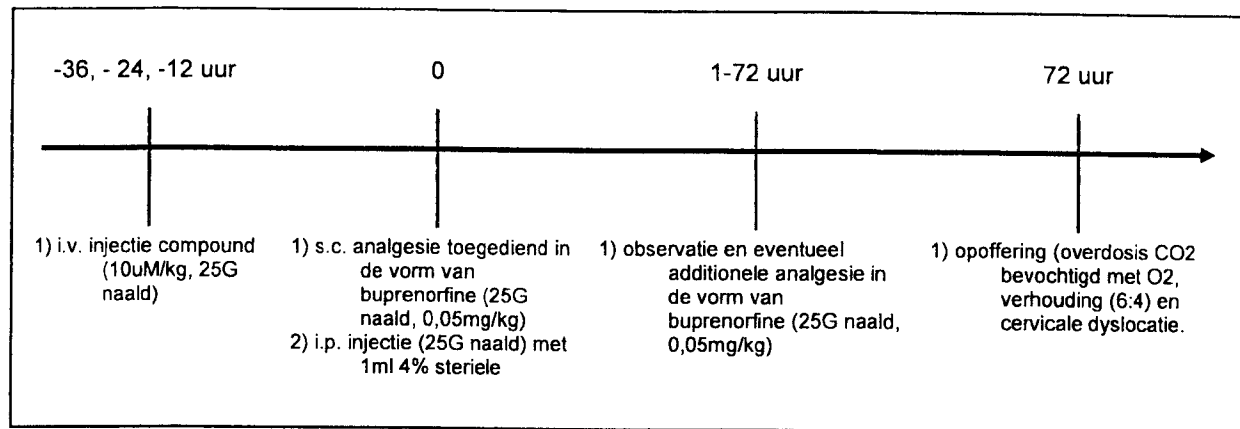
In dit experiment willen we onderzoeken wat het effect van de compounds is op de latere fase van een ontstekingsreactie. Het betreft dan met name de rol van macrofagen.

Set-up (afbeelding 3)

1. De compounds zullen intraveneus worden toegediend op tijdstip -36 uur, -24 uur en - 12 uur voor de inductie van de peritonitis. De streefconcentratie is 10 uM (op basis van het molgewicht en het gewicht van de muis zal de dosering worden berekend). Gegevens over de farmacokinetiek en farmacodynamiek van de compounds zijn op dit moment van de studie niet bekend. Zodra we de effectiviteit in vivo hebben onderzocht, zullen we de meeste effectieve compounds selecteren en hiervan de farmacokinetiek en farmacodynamiek onderzoeken.
2. Pijnstilling: buprenorfine, 0.05mg/kg, s.c.

3. 30 minuten wachten (inwerktijd pijnstilling)
4. Inductie peritonitis: thioglycollaat, 4% oplossing in 0.9%NaCl, 1 ml.
5. Opoffering: 72 uur na inductie van de peritonitis zullen de muizen worden opgeofferd (overdosis CO2 bevochtigd met O2, verhouding (6:4) en cervicale dyslocatie).
6. Isolatie van peritoneale cellen, bloed, milt, beenmerg.

De controlegroep zal geïnjecteerd worden met 1 ml 0.9% NaCl oplossing i.p.v. de compounds. Voorts wordt er geen peritonitis geïnduceerd.



Afbeelding 3: Flowchart voor de muizen in experiment II.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er is geen aanleiding om anesthesie toe te passen in de voorgestelde experimenten.

9b. Pijnbestrijding

- Voor i.v. injectie t.b.v. compoundtoediening is geen pijnbestrijding geïndiceerd.
- 30 minuten voor inductie van de peritonitis zal pijnstilling worden toegepast in de vorm van buprenorfine, 0.05mg/kg, s.c.. Indien noodzakelijk zal dit herhaald worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie: overdosis CO2 bevochtigd met O2, verhouding (6:4) en cervicale dyslocatie

Humane eindpunten: bij ernstig ongerief, zoals het wasting syndroom (gewichtsverlies (>15% in 24 h), slecht onderhouden vacht, slecht eten, algehele zwakte) of onvoorziene infecties zal het betreffende dier worden geeuthanaseerd.

Op basis van de in vitro experimenten en het design van de compounds verwachten we geen toxiciteit. We zullen de dieren na toediening van de compounds frequent (direct na, en 2 uur na elke injectie) controleren op eventuele bijwerkingen en/of toxiciteit.

Indien eenzelfde patroon bij meerdere dieren optreedt zal het experiment in overleg met de VO en proefdierdeskundige vroegtijdig worden beëindigd.

Zorg

10a. Ongerief

- Controle groep: deze groep zal, behoudens opoffering, geen handelingen ondergaan. Opoffering wordt gescored als gering/matig (2).
 - Experiment 1 en 2 (SHAM en testgroep):
 1. 3 i.v. injecties: dit zal matig (3) ongerief opleveren
 2. Inductie van peritonitis zal naar verwachting in matig (3) ongerief resulteren.
- Het totale ongerief (i.v. injecties + peritonitis) schatten we in op matig/ernstig (4). Door adequate pijnbestrijding hopen we het ongerief te minimaliseren.

10b. Welzijnsevaluatie

Registratie dient plaats te vinden in het welzijnsdagboek.

11. Verzorging en huisvesting

De verzorging en huisvesting vindt plaats in en conform de normen van de Centrale Proefdier Voorzieningen Maastricht, waarbij voedsel en water zullen ad libitum beschikbaar zullen zijn. Verder zullen de dieren in groepshuisvesting, met de gangbare kooiverrijking en een normaal dag/nacht ritme, op de experimentele gang van het CPV gehouden worden.

12. Deskundigheid

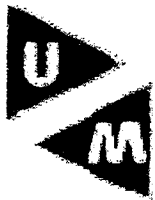
Deelnemende onderzoekers hebben alle de artikel 9 bevoegdheid. Verder hebben de onderzoekers ervaring met het uitvoeren van de beschreven experimenten.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

n.v.t.

Relevante literatuur

In de tekst wordt verwezen naar relevante literatuur.



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, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Inhibition of CD40L-CD40- interactions as therapeutic target in inflammatory disease*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- GGO is op dit protocol niet van toepassing, daarom kan het GGO nummer verwijderd worden van het voorblad.
- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC adviseert op het voorblad de code voor het doel van de proef aan te passen in code 31 en de code voor bijzondere technieken aan te passen in code 12.
- Bij punt 7c vraagt de DEC zich af of er niet volstaan kan worden met een controle groep voor beide tijdstippen (groep 4 weg laten?). Indien dit niet het geval is graag motiveren!
- Bij punt 10a verzoekt de DEC de laatste zin te verwijderen (Verder zal de relatief enzovoort). Verder merkt de DEC op dat het ongerief van de controle groepen in overeenstemming moet zijn met het voorblad.

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 2011-063, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan

....., voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht

Betreft: Projectaanvraag DEC 2011-63

Maastricht, 3 mei 2011

Geachte

naar aanleiding van uw correspondentie inzake de projectaanvraag 2011-63 stuur ik u deze brief. Uw aanbevelingen en opmerkingen overwegende zijn onderstaande veranderingen aangebracht in de projectaanvraag:

- *GGO is op dit protocol niet van toepassing, daarom kan het GGO nummer verwijderd worden van het voorblad.*
Het GGO nummer is verwijderd van het voorblad.
- *De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.*
Dit is aangepast, de correcte duur van de proef is 108 uur.
- *De DEC adviseert op het voorblad de code voor het doel van de proef aan te passen in code 31 en de code voor bijzondere technieken aan te passen in code 12.*
De codes zijn aangepast.
- *Bij punt 7c vraagt de DEC zich af of er niet volstaan kan worden met een controle groep voor beide tijdstippen (groep 4 weg laten?). Indien dit niet het geval is graag motiveren!*
Het advies is overgenomen in de aanvraag. Gezien het korte tijdsverschil tussen beide groepen is het wetenschappelijk verantwoord een controlegroep (groep 4) te laten vervallen. Het totaal aantal dieren op de aanvraag is teruggebracht tot 104 muizen (dit was 112).
- *Bij punt 10a verzoekt de DEC de laatste zin te verwijderen (Verder zal de relatief enzovoort).*
Verder merkt de DEC op dat het ongerief van de controle groepen in overeenstemming moet zijn met het voorblad.
De betreffende zin is verwijderd. De juiste ongerief score voor de controlegroep is vermeld op het voorblad.

Bovenstaande opmerkingen zijn opgenomen in de herziene versie van de projectaanvraag, deze zijn door middel van een grijze markering aangegeven. Ik hoop u voldoende te hebben geïnformeerd.

Hoogachtend,

Maastricht University



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
29-05-2011

Project: *Inhibition of CD40L-CD40-TRAF6 interactions as therapeutic target in inflammatory disease.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij 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
I

Projectnummer: 2011-063
Diersoort: muis
Aantal dieren: 104
Einddatum: 25-05-2015

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