

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM**DECNR: 2011-058**

Versie 2006

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

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
30-05-2011	Nieuw	02/141	

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

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

Financieel beheerder		Budgetnummer	30983239N
-------------------------	--	--------------	-----------

Titel van het onderzoek: The role of Cbl-b in atherogenesis

 startdatum **01/05/2011** einddatum ⁹ **01/05/2014** *Duur van de proef¹⁰:* **29 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. Verantwoorde- lijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art 9	
4. overige uitvoerenden					

Diergroep	1 <i>Exp I</i>	2 <i>Exp I</i>	3 <i>Exp II</i>	4 <i>Exp II</i>	5 <i>Exp II Donor</i>	6 <i>Exp II Donor</i>
Crtl/exp/sham	Exp	Cntrl	Exp	Exp	Exp	Exp
Diersoort	01	01	01	01	01	01
Stam	Cbl-b-/- ApoE-/-	ApoE-/-	Cbl-b-/- ApoE-/-	ApoE-/-	Cbl-b-/- ApoE-/-	ApoE-/-
Construct/mutatie	-	-	-	-	-	-
Herkomst	01	01	01	01	01	01
Aantal	36	36	40	40	8	8
Geslacht	M/V	M/V	M/V	M/V	M/V	M/V
Dieren immuuncompetent	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Leeftijd (wkn) /gewicht (g)	5-29/ 20-30	5-29/ 20-30	5-29/ 20-30	5-29/ 20-30	5-29/ 20-30	5-29/ 20-30
Doel van de proef	31	31	31	31	31	31
Belang van de proef	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken	09	09	09	09	01	01
Anesthesie	04	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding	01	01	01	01	01	01
Mate ongerief	02	02	04	04	02	02
Toestand dier einde exp.	01	01	01	01	01	01

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: The role of Cbl-b in atherogenesis

1. Doel van de proef.

Atherosclerose is een chronische ontstekingsziekte van de bloedvatwand die zich kenmerkt door de vorming van atherosclerotische plaques. Activatie van ontstekingscellen speelt een essentiële rol in het ontstaan van atherosclerotische plaques (*Hansson et al. Nature Immunology, 2011*). Het eiwit Cbl-b heeft een regulerend effect op de activatie van deze ontstekingscellen (*Paolino et al. Semin. Immunopathol. 2010*). In het voorgestelde project willen we onderzoeken wat de functie is van Cbl-b in ontstekingscellen en overige cellen (zoals gladde spiercellen en endotheelcellen die ook betrokken zijn bij atherogenese) tijdens het ontstaan van atherosclerose. Dit project zal ons meer inzicht geven in het ontstekingsproces dat ten grondslag ligt aan atherosclerose, waardoor het mogelijk kan worden nieuwe therapeutische targets te identificeren.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Atherosclerose is de primaire oorzaak van hart- en vaatziekten en is daardoor verantwoordelijk voor circa 50% van de sterfgevallen in de Westerse Wereld. In het voorgestelde onderzoek willen we het ontstekingsproces bestuderen dat ten grondslag ligt aan de initiatie, progressie van een atherosclerotische plaque. Door in te grijpen in dit proces zou het mogelijk kunnen worden om complicaties van atherosclerose, zoals het hart- en herseninfarct, te verminderen.

3. Alternatieven

De ApoE^{-/-} muis is een diermodel voor atherosclerose dat veelvuldig worden toegepast door onze onderzoeksgroep en door vele onderzoeksgroepen in de wereld (*Lutgens et al. Nature Med. 1999, Lievens et al. Blood 2010, Lutgens et al. JEM 2010*).

Het ontstaan van atherosclerose is een erg complex proces dat afhankelijk is van de functie van vele interacterende cellen, cytokines, chemokines, mechanische factoren, etc. Dit kan onvoldoende worden nagebootst in louter in-vitro technieken, zoals cel- of weefselkweek. Er zijn dus geen alternatieven voor de voorgestelde dierexperimenten.

4. Ethische afweging

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

5. Wetenschappelijke onderbouwing

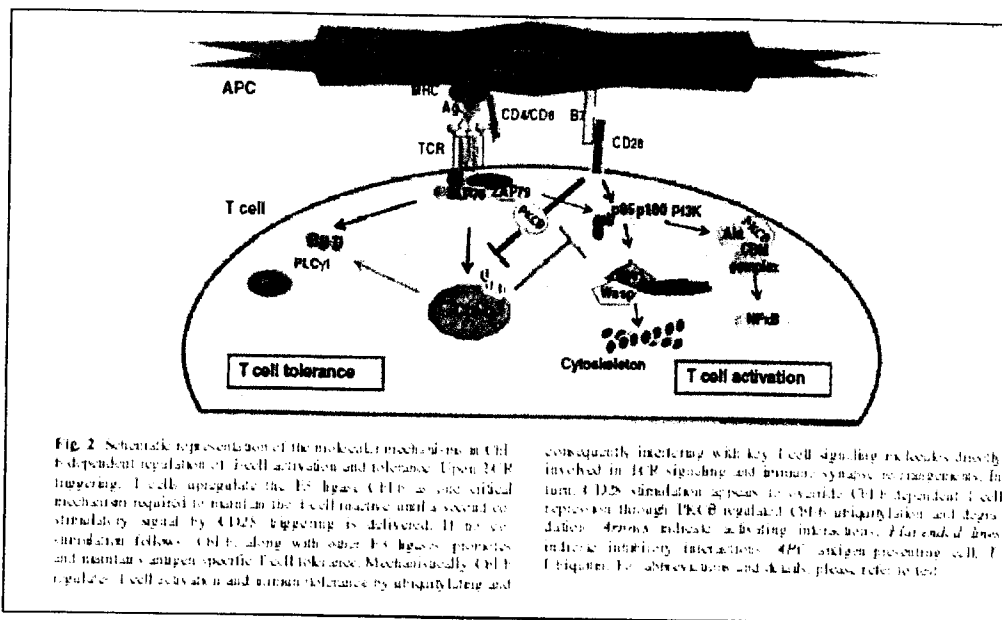
Atherosclerose is een chronische ontstekingsziekte van de bloedvatwand die zich kenmerkt door de vorming van atherosclerotische plaques. Als deze plaques ruptureren ontstaat er een stolsel in het bloedvat, dit uit zich klinisch als een hart- of herseninfarct. Verschillende typen cellen zijn betrokken bij het ontstaan van de plaques. Eén van de celtypen betreft de T-cel.

T-cellen worden tijdens de atherogenese geactiveerd door dendritische cellen. Vervolgens zullen geactiveerde T-cellen andere ontstekingscellen, zoals B-cellen en macrofagen activeren. Uiteindelijk zal door deze cascade van cel activatie een chronische ontsteking ontstaan. Activatie van T-cel speelt dus een essentiële rol in de totstandkoming van atherosclerotische plaques (*Hansson et al. Nature Immunology, 2011*).

Naast ontstekingscellen zijn ook andere celtypen betrokken bij het ontstaan van atherosclerotische plaques, zoals endotheel cellen en gladde spiercellen. Activatie van endotheelcellen is bijvoorbeeld een van de eerste stappen in het ontstaan van atherosclerose (*Engel et al. Sem Immunol. 2010*).

Een eiwit dat een essentiële rol speelt in de activatie van zowel ontstekingscellen. Cbl-b is een intracellulair eiwit dat ervoor zorgt dat bijvoorbeeld T-cellen minder snel geactiveerd worden (zie onderstaande afbeelding, *Paolino et al. Semin. Immunopathol. 2010*). Remming van de activatie van T-cellen kan in theorie atherogenese remmen. Cbl-b zou dus een beschermend eiwit kunnen zijn voor het ontstaan van atherosclerose, dit is echter nooit onderzocht. Enkele studies hebben aangetoond dat Cbl-b ook tot expressie komt in non-hematopoietische cellen (*Zhang et al. J. Pathol. 2009, Griffiths et al. Mol. Cel. Biol. 2003*).

In het voorgestelde project willen we onderzoeken op welke functie Cbl-b heeft in het ontstaan van atherosclerose. Dit willen we doen door gebruik te maken van een Cbl-b/-/ApoE/- en ApoE/- muismodel van atherosclerose en een beenmergtransplantatie. Dit project zal ons meer inzicht geven in het ontstekingsproces dat ten grondslag ligt aan atherosclerose, waardoor het mogelijk kan worden nieuwe therapeutische targets te identificeren.



6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is gelezen en akkoord bevonden door

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort, stam:

1. Cbl-b-/-ApoE-/- muizen (test groep)
2. ApoE-/- muizen (controle groep)

Herkomst: de muizenstammen worden binnen het CPV gefokt.

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

De experimenten worden toegelicht bij punt 8, onderstaand wordt een overzicht van de aantallen dieren per experiment gegeven.

Experiment 1:

Om een goed inzicht te krijgen in de rol van Cbl-b tijdens atherogenese is het noodzakelijk om in de initiële fase (week 17) en latere fase (week 29) van de ziekte een analyse uit te voeren (zie punt 8). In totaal hebben we dus 4 groepen nodig (vroeg-test, vroeg-controle, laat-test, laat-controle).

Op basis van eerdere atherosclerose experimenten binnen onze groep weten we dat de gemiddelde $\sigma = 47.5$ en $\delta = 45$ (plaque grootte als parameter). Volgens de formule van L. Sachs met een betrouwbaarheid van 80% volgt: $F_{0,80} = 15,7 \rightarrow n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 \rightarrow n = 15,7 * (47.5/45)^2 \rightarrow n = 17.5 \rightarrow n = 18$

Dus $4 \times 18 = 72$ muizen

Experiment 2:

In dit experiment willen we specifiek onderzoeken wat de rol van Cbl-b in hematopoietische cellen is tijdens het ontstaan van atherosclerose. Dit willen we doen door Cbl-b-/-ApoE-/- muizen te transplanteren met ApoE-/- beenmerg. En vice versa, ApoE-/- muizen transplanteren met Cbl-b-/-ApoE-/- beenmerg. Ook hier is het van belang om op een vroeg een laat tijdstip in de atherogenese de analyses uit te voeren. Dit betekent dat we 4 diergroepen nodig hebben.

Powerberekening groeps-grootte ontvangers voor beenmergtransplantaties (BMTs):

Op basis van eerdere BMTs binnen onze groep weten we dat de gemiddelde $\sigma = 47.5$ en $\delta = 45$ (plaque grootte als parameter). Volgens de formule van L. Sachs met een betrouwbaarheid van 80% volgt: $F_{0,80} = 15,7 \rightarrow n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 \rightarrow n = 15,7 * (47.5/45)^2 \rightarrow n = 17.5$

Er wordt rekening gehouden met een maximale uitval van 10 % (t.g.v. complicaties BMT), dus $17.5 + 10\% = 19.4 = 20$ muizen per groep.

Dus $4 \times 20 = 80$ muizen

Om voldoende donor beenmerg te kunnen isoleren zullen we 4 donoren per diergroep nodig hebben. Dus 2×4 ApoE-/- muizen en 2×4 Cbl-b-ApoE-/- muizen. In totaal **16 donor muizen**.

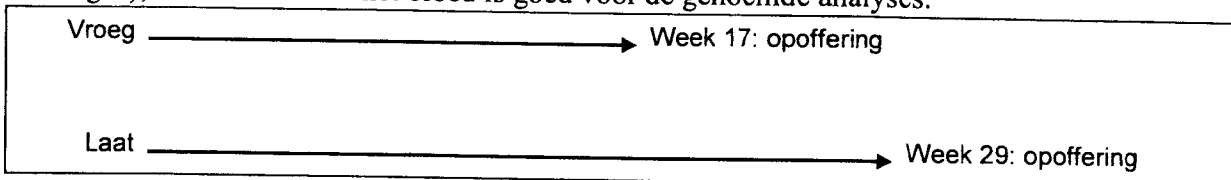
Totaal aantal dieren op deze DEC aanvraag: $72 + 80 + 16 = 168$ muizen

6 Dierproef

8. Experiment

Experiment 1:

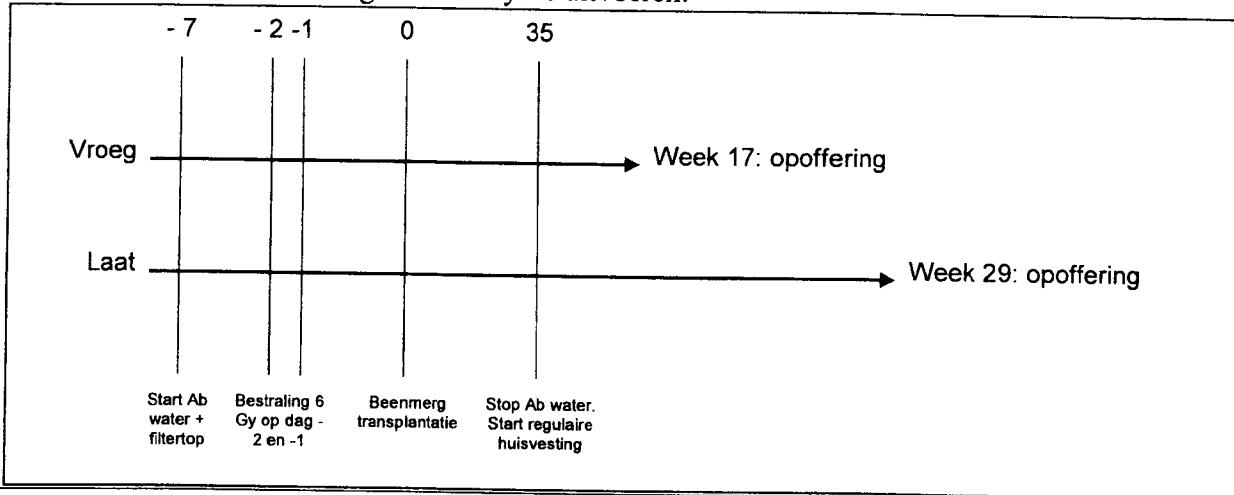
Om een goed inzicht te krijgen in de rol van Cbl-b tijdens atherogenese is het noodzakelijk om in de initiële fase en latere fase van de ziekte een analyse uit te voeren. Dit zullen we doen door Cbl-b^{-/-}ApoE^{-/-} muizen en ApoE^{-/-} muizen op de leeftijd van 17 weken (vroeg) en 29 weken (laat) op te offeren. Vervolgens zullen de arteriële vaatboom, bloed, milt, thymus en lymfeknopen worden uitgenomen voor histologische analyse en immunofenotypering middels FACS. Bloedafname wordt uitgevoerd d.m.v. orbitapunctie na pentobarbital injectie (zodra de knijpreflex bij de muis afwezig is); de kwaliteit van het bloed is goed voor de genoemde analyses.



Figuur 1: de flowchart van de dieren in experiment 1.

Experiment 2:

In dit experiment willen we specifiek onderzoek wat de functie is van Cbl-b in hematopoietische cellen (in tegenstelling tot experiment 1, waar we de rol van Cbl-b in alle celtypen onderzoeken). Dit doen we door een beenmergtransplantatie uit te voeren waarbij ApoE^{-/-} beenmerg in Cbl-b^{-/-} ApoE^{-/-} ontvangers zal worden getransplanteerd, en vice versa. Ook hier willen we op een vroeg en later stadium in de atherogenese analyses uitvoeren.



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie: Euthanasie: anesthesie d.m.v. intraperitoneale pentobarbital injectie (1:10 verdund in NaCl, 100mg/kg), waarna bloedafname d.m.v. orbitapunctie, gevolgd door euthanasie (cervicale dislocatie).

9b. Pijnbestrijding: voor i.v. injectie t.b.v. de BMT is geen pijnbestrijding geïndiceerd.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie: anesthesie d.m.v. intraperitoneale pentobarbital injectie (1:10 verdund in NaCl, 100mg/kg), waarna bloedafname d.m.v. orbitapunctie, gevolgd door euthanasie (cervicale dislocatie).

Humane eindpunten: bij ernstig ongerief, zoals het wasting syndroom (gewichtsverlies >15% in 24 h, >20% in 7 dagen), slecht onderhouden vacht, slecht eten, algehele zwakte) of onvoorziene infecties zal het betreffende dier worden geëuthanaseerd. Indien eenzelfde patroon bij meerdere

dieren optreedt, zal het experiment in overleg met de VO en proefdierdeskundige vroegtijdig worden beëindigd.

10a. Ongerief

Experiment 1: eenmalige i.p. injectie met pentobarbital, gevolgd euthanasie wordt als gering gescored (2).

Experiment 2:

- Donoren: eenmalige i.p. injectie met pentobarbital, gevolgd euthanasie wordt als gering gescored (2).
- Ontvangers: op basis van ervaring met BMTs binnen onze afdeling schatten we het ongerief van deze procedure (inclusief bestraling) normaliter in op matig (3). Ongerief van de afzonderlijke handelingen: bestraling: gering tot matig (2-3), i.v. injectie matig (3), herstelfase na BMT: gering tot matig (2-3). Zodra gesignaleerd zal worden dat een dier niet goed herstelt zal maximaal ondersteunende therapie ingezet worden (2 maal daags 500 ul 3% glucose + 0.9% NaCl s.c. en frequentie observatie).

10b. Welzijnsevaluatie

Registratie dient plaats te vinden in het welzijnsdagboek. Complicaties van de bestraling zullen expliciet worden vermeld.

11. Verzorging en huisvesting

Experiment 1: de verzorging en huisvesting vindt plaats in en conform de normen van de CPV, 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.

Experiment 2: de ontvangers van de BMT zullen gedurende 5 weken antibiotica water (neomycine 100 mg/L en polymixine 60.000 U/L) krijgen, dit wordt aangeleverd door de VO/VVO. Dit zal 3 maal per week worden vervangen door het CPV. Verder zullen de dieren in groepshuisvesting, met de gangbare kooiverrijking en een normaal dag/nacht ritme, op de gang van het CPV, onder filtertop gehouden worden. Na 5 weken kunnen de muizen zonder filtertop gehouden worden, met regulier water.

12. Deskundigheid

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

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Beenmerg transplantatie, SOP Gen-19-M

Relevante literatuur

De relevante referenties worden in de tekst genoemd.



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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*The role of Cbl-b in atherogenesis*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC adviseert op het voorblad de code voor het doel van de proef aan te passen in code 31.
- De DEC verzoekt bij punt 10a de zin "In zeer uitzonderlijke gevallen kan het ongerief oplopen tot ernstig" te verwijderen.

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 2011-058, 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 2011-58

Maastricht, 3 mei 2011

Geacht

naar aanleiding van uw correspondentie inzake de projectaanvraag 2010-58 stuur ik u deze brief. Uw aanbevelingen en opmerkingen overwegende zijn onderstaande veranderingen aangebracht in de projectaanvraag:

- *De DEC adviseert op het voorblad de code voor het doel van de proef aan te passen in code 31.*
Dit is aangepast.
- *De DEC verzoekt bij punt 10a de zin "In zeer uitzonderlijke gevallen kan het ongerief oplopen tot ernstig" te verwijderen.*
De betreffende zin is verwijderd.

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**Maastricht*
30-05-2011**Project:** *The role of Cbl-b in atherogenesis.*

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

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

Bezoekadres**Projectnummer:** 2011-058**Diersoort:** muis**Aantal dieren:** 168**Einddatum:** 30-05-2015**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