

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie**DECNR: 2011-043****Ontvangen: 06-04-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag₂
06-04-2011	Nieuw

VROM/GGONR³**GGO 01-036****LNV/CBDNR⁴**

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 31961946N

Titel van het onderzoek: De rol van inflammasome activatie en autophagy in NASH: *in vitro* studie.

startdatum

4/2011

einddatum⁹

3/2015

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	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.12	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. PI					

Diergroep	In vitro
ctrl/exp/sham	nvt
Diersoort	muis
Stam	C57Bl6
Construct / mutatie ?	LDLR-/-
Herkomst (leverancier) *	01
Aantal	24
Geslacht	Man/Vrouw
Dieren immuuncompetent ?	Ja
Leeftijd/gewicht	8-12 weken
Doel van de proef *	31
Belang van de proef *	01
Toxicologisch onderzoek *	01
Bijzondere technieken *	02
Anesthesie *	01
Pijnbestrijding *	01
Mate ongerief *	01
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: De rol van inflammasome activatie en autophagy in NASH: *in vitro* studie.

1. Doel van de proef.

Binnen de groep Moleculaire Genetica wordt onder andere onderzoek gedaan naar de rol van verschillende factoren in de ontwikkeling van non alcoholic steatohepatitis (NASH). Dit ziektebeeld gaat gepaard met de aanwezigheid van vetaccumulatie in de lever en ontsteking. 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.

Twee processen waarvan is aangetoond dat lysosomale cholesterol stapeling er een invloed op heeft zijn inflammasome activatie en autophagy. In dit project willen we nagaan of deze processen een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van leverontsteking. We willen het effect op ontsteking bestuderen na modulatie van deze processen in macrofagen. Dit kan gebeuren door *in vitro* beenmergmacrofagen te activeren met verschillende stimuli waarbij vervolgens in verschillende condities deze processen gemoduleerd worden.

Door dit project krijgen we inzicht in de rol van inflammasome activatie en autophagy met betrekking tot ontsteking, zodat we een link naar leverontsteking kunnen leggen. Op deze manier zouden we nieuwe targets kunnen identificeren voor mogelijke diagnose, preventie en 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

In vitro experimenten vormen in dit geval een goede aanvulling op onze *in vivo* studie, maar geen vervanging van muismodellen. Voor deze *in vitro* proeven zullen we vooral gebruik maken van uit genetisch gemodificeerde dieren afkomstige cellen. Deze zijn niet op een andere manier te verkrijgen en zijn ongeschikt om in te vriezen. Waar mogelijk zullen deze primaire muiscellen vervangen worden door het gebruik van macrofaag-cellijnen, deze cellijnen vertonen echter niet altijd dezelfde reactie als uit muizen geïsoleerde macrofagen en zijn daarom vaak geen volwaardig alternatief.

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). Door het gebruik van primaire cellen van deze dieren wordt het aantal proefdieren ook al minder, maar het is nog steeds noodzakelijk om deze proefdieren te gebruiken om te achterhalen wat het verschil in inflammatie veroorzaakt bij deze hyperlipidemische modellen. Op deze manier trachten we het mechanisme van NASH beter in kaart te brengen.

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.

Eerder onderzoek in onze groep 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. Twee processen waarvan is aangetoond dat lysosomale cholesterol stapeling er een invloed op heeft zijn inflammasome activatie en autophagy. In verscheidene modellen voor lysosomale stapelingsziekten, waarin er een teveel aan cholesterol in de lysosomen aanwezig is, werd **verminderde autophagy** vastgesteld. Activatie van zogenaamde **inflammasomen** zal leiden tot de vrijzetting van pro-inflammatoire cytokines en uiteindelijk inflammatie veroorzaken.

Tijdens deze proef willen we ter ondersteuning van de *in vivo* proeven (DEC 2010-188), ook *in vitro* de rol van inflammasome activatie en autophagy onderzoeken met betrekking tot inflammatie. Beenmergmacrofagen zullen geanalyseerd worden voor eiwit- en genexpressie, cytokine productie, lipide stapeling, cel turnover (apoptose en proliferatie) na behandeling met inhibitors/stimulatoren van inflammasome activatie of autophagy en activatie met verschillende leverinflammatie gerelateerde stimuli (bijv. oxLDL). Op deze manier kunnen we het effect van de verschillende stimuli op inflammatie testen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC-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). Na de proef worden de dieren opgeofferd.

7b. Sexe

Voor de uit te voeren experimenten worden beide sexen gebruikt afhankelijk van de beschikbare hoeveelheid dieren.

7c. Aantallen

Voor de verschillende in vitro experimenten die we willen doen (cytokine productie, lipide stapeling, cel turnover na verschillende stimuli) hebben we cellen nodig uit 4 dieren. Uit eerdere experimenten (b.v. Kanters et al. JCI 2003) is gebleken dat er variatie in tijd is als de experimenten herhaald worden. De eerdere variatie was $\sigma=30$, en met een gemiddeld effect op cytokine productie van $\delta=50$. Dit levert (met Sachs of PS program) $n=6$ herhalingen op (er is praktisch geen uitval bij deze proeven). Echter, de praktijk kan uitwijzen dat we bij bepaalde experimenten/modellen met minder herhaling toekunnen. We vragen dus dieren aan voor 6 herhalingen omdat de statistiek met onze eerdere experimenten dat aangeeft maar het zou kunnen dat we in bepaalde gevallen met minder herhalingen kunnen volstaan. In dat geval zullen er dus minder dieren gebruikt worden.

In totaal komen we dus uit op 24 LDLR knock out muizen

Dierproef

8. Experiment

De dieren worden op standaard chow voer en water gehouden en zullen niet *in vivo* worden behandeld. Voor de isolatie van Kupffercellen uit de lever zal de lever uit de muis worden geïsoleerd waarna hier verder mee kan gewerkt worden. Voor het isoleren van beenmerg macrofagen worden de botjes uit deze muizen geïsoleerd.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er wordt geen anesthesie toegepast aangezien dit niet nodig is omdat we dieren zonder voorgaande behandeling op een gecontroleerde manier opofferen.

9b. Pijnbestrijding

Pijnbestrijding is niet nodig bij deze experimenten.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Aangezien er bij de proefdieren geen experimentele handelingen worden uitgevoerd en enkel gebruikt worden voor primaire celcultuur, zijn er geen humane eindpunten voor deze proef voorzien. Euthanasie zal plaatsvinden door cervicale dislocatie of O₂/CO₂ euthanasie.

Zorg

10a. Ongerief

De dieren die zullen worden gebruikt, worden gehouden op standaard voer en water en zullen niet *in vivo* worden behandeld. Het te verwachten ongerief voor de beenmergdonoren is gering (01) (doden mbv cervicale dislocatie of CO₂/O₂ (6:4) zonder voorafgaande handelingen).

10b. Welzijnsevaluatie

De dieren die zullen worden gebruikt, worden gehouden op standaard voer en water en zullen niet *in vivo* worden behandeld. In eerdere experimenten van onze afdeling werden geen duidelijke tekenen van ongerief bemerkt.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen sociaal gehuisvest worden in het CPV van de UM onder standaard condities met vrij toegang tot water en voer en een normaal dag/nacht ritme.

12. Deskundigheid

Binnen de zijn er voldoende mensen die deskundig zijn in het isoleren van beenmergmacrofagen. Er wordt met deze mensen samengewerkt.
De bevoegde personen zijn allen in bezit van artikel 9 en/of 12

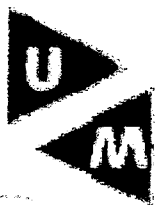
13. Standard Operation Procedures (SOP)

Isolatie beenmerg-macrofagen:

1. Cut off the hind legs after removing the skin.
2. Isolate femurs and tibia from the mice and remove most of the skeletal muscles (note 3).
3. Put the bones in PBS, keep on ice and take to flow cabinet.
4. Sterilize the bones by submerging them for 30 seconds in 70% ethanol in a petri dish.
5. Transfer to sterile PBS in a petri dish.
6. Take a bone between forceps, cut off the ends and flush the bone using PBS by inserting a 25G needle at one end.
7. Collect bone marrow in a 50ml tube.
8. Repeat previous steps for all the bones.
9. Make the bone marrow cell suspension single cell by first passing it through a 19G needle, transfer it to a new tube and then pass it through a 25G needle.
10. Count the cells.
11. Spin the cells down at 1000rpm, 5 min at 4°C.
12. Resuspend the cells in RPMI 1640 / 2% FCS / 5U/ml heparin at a density of 5×10^7 cells/ml and keep on ice.

Opofferen:

De opoffering gebeurt dmv cervicale dislocatie of O₂/CO₂ verstikking.



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- 44 44 44

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*De rol van inflammasome activatie en autophagy in NASH: in vitro studie*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

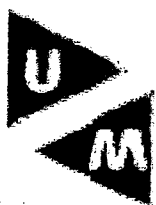
De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.

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 **2011-043**, 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, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*De rol van inflammasome activatie en autophagy in NASH: in vitro studie*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

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 op 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 2011-043, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
07-04-2011

Project: *De rol van inflammasome activatie en autophagy in NASH: in vitro studie.*

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

Projectnummer: 2011-043
Diersoort: muis
Aantal dieren: 24
Einddatum: 06-04-2015

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