

95

# Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-126

Ontvangen: 28-09-2011

| DEC datum goedkeuring# | Type aanvraag |
|------------------------|---------------|
| 28-09-2011             | Nieuw         |

| VROM/GGONR <sup>3</sup> |
|-------------------------|
| 02-282                  |

| LNV/CBDNR <sup>4</sup> |
|------------------------|
|                        |

| Hoofdproject | NUTRIM |  |  |  |  |  |
|--------------|--------|--|--|--|--|--|
|--------------|--------|--|--|--|--|--|

| Deelproject | 3 |  |  |  |  |  |
|-------------|---|--|--|--|--|--|
|-------------|---|--|--|--|--|--|

| Financieel beheerder |  |
|----------------------|--|
|----------------------|--|

| Budgetnummer | 31962181B |
|--------------|-----------|
|--------------|-----------|

Titel van het onderzoek:

De rol van spier GR-signalering in hypoxie-geïnduceerde spieratrofie.

startdatum 01-12-2011

einddatum <sup>9</sup> 31-11-2014

Duur van de proef<sup>10</sup>: 4 dagen

|                                                      | Naam | Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM) | E-mailadres | Bevoegdheid <sup>5</sup> | Cap. groep /afdeling |
|------------------------------------------------------|------|---------------------------------------|-------------|--------------------------|----------------------|
| 1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)                 |      |                                       |             | Art.9                    |                      |
| 2. Vervanger VO (VVO)                                |      |                                       |             | Art.9                    |                      |
| 3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO <sup>7</sup> |      |                                       |             | Art.9                    |                      |
| 4. overige uitvoerenden                              |      |                                       |             | Art.12&9                 |                      |
| 5. PI                                                |      |                                       |             | Art. 9                   |                      |

| Diergroep                 | 1                                            | 2                                            | 3                                            | 4                                            | 5                                            | 6                                            |  |
|---------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|--|
| ctrl/exp/sham             | ctrl                                         | sham                                         | exp                                          | ctrl                                         | sham                                         | exp                                          |  |
| Diersoort                 | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Stam                      | C57bl6                                       | C57bl6                                       | C57bl6                                       | C57bl6                                       | C57bl6                                       | C57bl6                                       |  |
| Construct / mutatie ?     | MLC-Cre <sup>+/+</sup> x GR <sup>fl/fl</sup> | MLC-Cre <sup>+/+</sup> x GR <sup>fl/fl</sup> | MLC-Cre <sup>+/+</sup> x GR <sup>fl/fl</sup> | MLC-Cre <sup>+/+</sup> x GR <sup>fl/fl</sup> | MLC-Cre <sup>+/+</sup> x GR <sup>fl/fl</sup> | MLC-Cre <sup>+/+</sup> x GR <sup>fl/fl</sup> |  |
| Herkomst (leverancier) *  | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Aantal                    | 9                                            | 9                                            | 11                                           | 9                                            | 9                                            | 11                                           |  |
| Geslacht                  | m                                            | m                                            | m                                            | m                                            | m                                            | m                                            |  |
| Dieren immuuncompetent ?  | ja                                           | ja                                           | ja                                           | ja                                           | ja                                           | ja                                           |  |
| Leeftijd/gewicht          | 10-13 wk                                     | 10-13 wk                                     | 10-13 wk                                     | 10-13 wk                                     | 10-13 wk                                     | 10-13 wk                                     |  |
| Doel van de proef *       | 33                                           | 33                                           | 33                                           | 33                                           | 33                                           | 33                                           |  |
| Belang van de proef *     | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Toxicologisch onderzoek * | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Bijzondere technieken *   | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Anesthesie *              | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Pijnbestrijding *         | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |
| Mate ongerief *           | 02                                           | 03                                           | 03                                           | 02                                           | 03                                           | 03                                           |  |
| Toestand dier einde exp*  | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           | 01                                           |  |

\* VHI-coderingen zie bijlage

# 1 Verantwoording

*Aanvraag dierproef DEC-UM* (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)  
**Titel:** De rol van spier GR-signalering in hypoxie-geïnduceerde spieratrofie.

## 1. Doel van de proef.

Patiënten met COPD (chronisch obstructief longlijden) hebben niet alleen te kampen met de directe effecten van falende longfunctie, maar ook met de incapaciterende effecten van spieratrofie. Spieratrofie beïnvloedt niet alleen de kwaliteit van leven maar ook de levensverwachting. Het achterhalen van de oorzaken van spieratrofie en de daaraan ten grondslag liggende signaal transductie zal aangrijpingspunten bieden voor de ontwikkelingen van meer doelmatige therapieën om spiermassa en -functie te handhaven of herstellen in COPD.

Een van de vermoedelijke oorzaken van spieratrofie is hypoxemie (verlaagde zuurstofspanning in het bloed) a.g.v. een verminderde gasuitwisseling in de zieke long. Ons en andere laboratoria postuleren dat de daaruit volgende weefsel hypoxie leidt tot spieratrofie. Eerder onderzoek door onze groep toonde inderdaad dat muizen blootgesteld aan hypoxie (verlaagde zuurstofconcentratie in de lucht) spieratrofie ontwikkelen die niet kan worden verklaard door een verminderde voedselinname (DEC 2008-154).

Daarnaast bleek uit deze studies dat er sprake was van sterk verhoogde glucocorticoid receptor (GR) signalering in de spier. Aangezien bekend is dat (toediening van) glucocorticoiden ook spieratrofie induceert is het doel van deze proef om in een diermodel van COPD de bijdrage van circulerende, endogene glucocorticoiden aan hypoxie-geïnduceerde spieratrofie te bepalen door de effecten van hypoxie op spiermassa te vergelijken tussen wild type muizen en genetisch gemodificeerde muizen waarin expressie van de GR in de spier selectief afwezig is (GR-KO).

## 2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Sinds het begin van de jaren tachtig is het aantal COPD patiënten gestegen met  $\pm 40\%$ , en COPD is heden doodsoorzaak 4 in Nederland. Naar verwachting zal de COPD incidentie verder toenemen door de toenemende luchtvervuiling en de vergrijzing van onze samenleving. De verkregen kennis zal ons inzicht in de ontwikkeling en voortgang van spieratrofie bij patiënten met COPD vergroten en zal bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe, meer specifieke therapieën ter behandeling van spieratrofie in COPD.

## 3. Alternatieven

Binnen de vakgroep Pulmonologie wordt veel *in vitro* onderzoek gedaan naar de signaal transductie van spieratrofie.

Echter, in de huidige vraagstelling staat de bijdrage van GC/GR-signalering aan spieratrofie centraal in response op hypoxie, hetgeen een complexe interactie van een onbekend aantal organen/weefsels (minimaal 4; long-hypofyse-bijnier-spier) betreft. Deze interacties zijn niet (causaal) te bestuderen in celkweek of weefselmateriaal van COPD patiënten, en dit is de reden in dit geval te opteren voor een diermodel.

Dankzij de eerder opgedane ervaring uit eerdere experimenten in dit model en optimalisatie daarvan hebben we de uitval in de experimentele groep terug weten te dringen naar 20% (ipv 30%), hetgeen het aantal dieren dat vereist is om statistische verschillen te kunnen detecteren verlaagt.

#### 4. Ethische afweging

COPD is momenteel doodsoorzaak nummer 4, en spieratrofie bij COPD is een ongunstige prognostische factor en een onafhankelijke determinant van verlies van kwaliteit van leven. Momenteel ontbreken effectieve therapeutische interventies om spiermassaverlies te voorkomen of spiermassa te herstellen na spieratrofie in COPD. Het onderzoek zoals hier voorgesteld zal kunnen bijdragen aan het ontrafelen van de mechanismen van spieratrofie teneinde werkzame interventies te kunnen ontwikkelen. Naar onze mening weegt dit alles op tegen het matige ongerief dat een deel van de muizen zal ervaren als gevolg van de door ons voorgestelde dierproef.

### Wetenschap

#### 5. Wetenschappelijke onderbouwing

COPD, CHF en kanker zijn ziekten die vaak gepaard gaan met een onvrijwillig verlies aan lichaamsgewicht (cachexia) (1). Een significant deel van dit verlies is toe te schrijven aan de afname van spiermassa (spieratrofie). Spieratrofie treft ongeveer 10-20% van deze patiënten en samen zijn deze aandoeningen verantwoordelijk voor ongeveer 35% van alle overlijdensgevallen in Nederland. Spieratrofie heeft ernstige fysieke gevolgen en draagt bij tot een verminderde kwaliteit van leven, mede dankzij de afname van spierkracht en uithoudingsvermogen. Het is algemeen aanvaard dat skeletspieratrofie, of gewoonweg wasting, in verband wordt gebracht met een toegenomen morbiditeit en mortaliteit. Uit klinisch oogpunt is het daarom zeer belangrijk om op zoek te gaan naar therapeutische strategieën die ons in staat kunnen stellen het verlies aan spiermassa bij patiënten met COPD, CHF of kanker te remmen of om te keren. Zulke strategieën moeten gericht zijn tegen belangrijke regulatoren van skeletspier plasticiteit. Het is met andere woorden noodzakelijk om regulatoire eiwitten te identificeren die de balans tussen spiergroei en spieraafbraak coördineren.

In beide gevallen lijkt er een belangrijke rol te zijn weggelegd voor glucocorticoid (GC) signalering door activatie van de GC-receptor (GR) in de skeletspier. Het is bekend dat toediening van GCs (bv dexamethason) leidt tot spieratrofie (2).

In COPD is hypoxemie volgend op een verstoorde gasuitwisseling a.g.v. longschade (emphyseem, chronische bronchitis) een mogelijke oorzaak van spieratrofie. Eerder onderzoek door onze groep toonde inderdaad dat muizen blootgesteld aan hypoxie (verlaagde zuurstofconcentratie in de lucht) spieratrofie ontwikkelen die niet kan worden verklaard door een verminderde voedselinname (DEC 2008-154). Daarnaast bleek uit deze studies dat er sprake was van sterk verhoogde glucocorticoid receptor (GR) signalering in de spier.

Daarom is het doel van deze proef om in een diermodel van COPD de bijdrage van circulerende, endogene glucocorticoiden aan hypoxie-geïnduceerde spieratrofie te bepalen door de effecten van hypoxie op spiermassa te vergelijken tussen wild type muizen en genetisch gemodificeerde muizen waarin expressie van de GR in de spier selectief afwezig is (GR-KO). Hierbij zal gebruik gemaakt worden van muizen die homozygoot drager zijn van een gefloxed (fl/fl) GR allel en al dan niet drager van een gen coderend voor Cre recombinase dat wordt geëxprimeerd onder controle van een spier-specifieke (MLC) promotor.

#### 6. Wetenschappelijke beoordeling

Deze DEC aanvraag is gelezen en goedgekeurd door de PI (voorblad) van deelproject 4 van TI-Pharma T1-201 "Systemic effecten van COPD" waartoe dit onderzoek behoort.

### 3 Proefdier

#### 7. Proefdier keuze

##### 7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

De keuze voor de muis is gebaseerd op het eerder gebruikte model van hypoxie-geïnduceerde spieratrofie voor de muis (DEC 2008-154).

De genetisch gemodificeerde muizen verkeren in een C57/BLJ6 achtergrond en de fok vindt plaats in de IVC unit van het CPV.

De genotypes die vergeleken zullen worden zijn MLC-Cre<sup>-/-</sup>xGR<sup>fl/fl</sup>, verder WT genoemd en MLC-Cre<sup>+/-</sup>xGR<sup>fl/fl</sup>, hierna GR-KO genoemd.

De dieren hebben een leeftijd van 12 weken aan het begin van de studie, zodat de longen volgroeid zijn. Aan het eind van de studie zullen ze onder narcose geëuthanaseerd worden om de organen en weefsels te isoleren.

##### 7b. Sexe

Epidemiologische onderzoeken bij patiënten met COPD geven aan dat er duidelijke verschillen bestaan tussen de twee geslachten. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat de morbiditeit én mortaliteit bij mannen hoger ligt dan bij vrouwen.

Spiergewichten in mannelijke en vrouwelijke dieren zijn verschillend en omdat de spreiding en verwachte verschillen gebaseerd zijn op spiergewichten uit voorgaande studies naar spieratrofie waarbij gebruik gemaakt is van muizen van het mannelijke geslacht, stellen we voor om in deze studies alleen mannelijke muizen te gebruiken.

##### 7.c. Aantallen

Uit eerder experimenten (o.a. DEC-2009-074) zijn m.b.t de primaire parameter, te weten spiergewicht het minimaal detecteerbare effect d (15.75%) en variantiecoëfficiënt ( $\sigma$ ) (11.5%) bekend. Op basis hiervan wordt de benodigde groepsgrootte bepaald op:

$$n = 15.7 \times \frac{[\sigma]^2}{(d)^2} = \frac{[11.5]^2}{[15.75]^2} = 8.4 \text{ dieren}$$

In dit protocol wordt er ongeveer 5% uitval verwacht voor de dieren die onderworpen worden aan normoxie (N) of verminderde voedselinname (pair feeding, PF).

Bij de dieren blootgesteld aan hypoxie (H) moet rekening worden gehouden met een uitval van 20%.

Per behandeling resulteert dit in de volgende groepsgroottes:

N: 5% uitval  $\rightarrow 8.2/0.95 = 8.8 = 9$  dieren per groep

PF: 5% uitval  $\rightarrow 8.2/0.95 = 8.8 = 9$  dieren per groep

H: 20% uitval  $\rightarrow 8.2/0.8 = 10.5 = 11$  dieren per groep

Per groep wordt een vergelijking gemaakt tussen 2 genotypes; in totaal  $(9+9+11) \times 2 = 58$  dieren.

## 4 Dierproef

### 8. Experiment

De muizen worden na spenen opgehokt in de uiteindelijke experimentele groepssamenstelling ter voorkoming van territoriaal gedrag ten tijde van het experiment, maar om zodoende toch sociale huisvesting mogelijk te maken.

Wanneer de muizen 12 weken zijn zal het experiment beginnen door de muizen in de H-groep stapsgewijs aan hypoxie (H) bloot te stellen (conform DEC 2008-154):  
de eerste 24h 12% O<sub>2</sub>, de volgende 24h 10% en tenslotte nog 48h op 8% O<sub>2</sub>.

Omdat bekend is dat dit hypoxie protocol de voedselinname van de muizen beïnvloedt, en een verminderde voedselinname spiergewicht beïnvloedt, zal op basis van de gemeten gemiddelde voedselinname per muis een pair-feeding (PF) groep worden geïncubeerd, waarbij dieren onder normoxische condities dezelfde hoeveelheid voedsel aangeboden krijgen als geconsumeerd door de dieren uit de H-groep.

De N-groep heeft voedsel ad libitum.

Overzicht van de groepen:

| 1  | 2  | 3  | 4    | 5    | 6    |
|----|----|----|------|------|------|
| WT | WT | WT | GRKO | GRKO | GRKO |
| N  | PF | H  | N    | PF   | H    |

WT= MLC-Cre<sup>+/+</sup>xGR<sup>fl/fl</sup>

GRKO= MLC-Cre<sup>+/+</sup>xGR<sup>fl/fl</sup>

N= normoxie

PF= pair-fed

H= hypoxie

De totale duur van het experiment voor elke groep bedraagt 4 dagen.

Aan het einde van het experiment worden de dieren geëuthanaseerd d.m.v. isofluraan overdosis en gevolgd door cardiaal punctie en worden longen en spieren verzameld (en gewogen) voor verdere biochemische en moleculair biologische bepalingen die kaderen binnen het atrofie onderzoek.

**9. Experimentele condities****9a. Anesthesie**

n.v.t..

**9b. Pijnbestrijding**

Ondanks het ongerief volgend uit de blootstelling aan hypoxie zullen de dieren geen pijn ondervinden. Bijgevolg zal het gebruik van analgetica niet noodzakelijk zijn (zie ook sectie 10).

**9c. Euthanasie en Humane eindpunten**

Muizen uit de N en PF groepen worden onder terminale anesthesie gebracht met isofluraan. De hypoxie (H) dieren zullen onder hypoxische condities (8% O<sub>2</sub>) met isofluraan verdoofd worden. Na 15 minuten onder anesthesie zal bloed worden afgenomen via cardiaal punctie. Na de bloed afname zal m.b.v. cervicale dislocatie de muis overlijden.

Gedurende het experiment wordt een logboek bij gehouden over het welzijn van de muizen. Hierbij wordt dagelijks gewicht gemeten en gelet op activiteit en algemene uiterlijk van de dieren. Mocht dieren tekenen van apathie vertonen of een ernstig gewicht verlies (-20%) zal worden overgegaan tot euthanasie van de muis.

## Zorg

### 10a. Ongerief

Overzicht aard, duur en frequentie van het ongerief:

|                            | Groep 1, 4 (N) | Groep 2, 5 (PF) | Groep 3, 6 (H)  |
|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| hypoxie                    | -              | -               | 1x, 4 dagen: 03 |
| Pair-feeding               | -              | 4x, 4 dagen: 03 | -               |
| Anesthesie zonder bijkomen | 1x: 02         | 1x: 02          | 1x: 02          |
| totaal                     | 02             | 03              | 03              |

N= normoxie

PF= pair-fed

H= hypoxie

### 10b. Welzijnsevaluatie

Het welzijn van de dieren zal tijdens experiment in de gaten worden gehouden en eventuele problemen besproken met artikel 14 functionaris. Tevens zal er een logboek bijgehouden worden met de gewichten en algehele status van de dieren

### 11. Verzorging en huisvesting

De muizen zullen worden gehuisvest in aparte ruimtes (kasten), speciaal gemaakt voor de hypoxische condities. Normoxische en hypoxische condities zullen in dezelfde type kasten worden gehuisvest. CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> zullen worden gecontroleerd.

De muizen zullen met 4 muizen samen in een standaard kooi worden gehuisvest.

Indien problemen, kan de VO worden gewaarschuwd. Indien niet bereikbaar wordt Art 14 gewaarschuwd.

### 12. Deskundigheid

De VO en VVO beschikken over jaren lange ervaring met dierexperimenten.

### 13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage

1. Eliason G, Abdel-Halim S, Arvidsson B, et al. Physical performance and muscular characteristics in different stages of COPD. *Scand J Med Sci Sports* 2008; 19:865–870.
2. Roy RR, Gardiner PF, Simpson DR, and Edgerton VR. Glucocorticoid-induced atrophy in different fibre types of selected rat jaw and hind-limb muscles. *Arch Oral Biol* 28: 639– 643, 1983.



## Bijlage 1

### S.O.P.

#### Opofferen van de muizen.

##### Doel

Op een bepaald tijdstip na intratracheale toediening van LPS wordt de muis opgeofferd om de gewenste lichaamsvloeistoffen en weefsels te verkrijgen. De muis wordt onder algehele terminale anesthesie gebracht m.b.v. isofluraan. Vervolgens wordt via een hartpunctie bloed verkregen, dat direct ontsdold wordt met heparin. Daarna wordt het diafragma doorgeprikt, waardoor de longen zullen klappen (non-functie van longen). Na een cervicale dislokatie kunnen vervolgens de spieren, longen en eventueel andere weefsels uit de muis worden genomen.

##### Benodigheden

- verschillende maten schaarstjes
- verschillende maten pincetten
- tondeuse
- isofluraan
- weegschaal
- 2 ml spuit
- heparine (5000 units/ml)
- oranje naalden (G25)
- bruine plakband

##### Werkwijze

1. Leg alle materiaal, scharen, pincetten ed, klaar.
  2. Weeg de muis.
  3. Verdoof de muis initieel met 5% isofluraan en daarna continu met 2%.
  4. Controleer of de muis goed verdoofd is.
  5. Scheer de buik van de muis
  6. Leg muis horizontaal op de tafel en plak pootjes en staart vast met plakband.
  7. Knip de muis open en verwijder de linker borstspier
  8. Doe een hartpunctie tussen linker rib 3 en 4 met behulp van een 25G naald op een 2 ml spuit gevuld met 10µl heparine.
  9. Prik een klein gaatje in het diafragma, waardoor een non-functie van de longen optreedt.
  10. Offer de muis op via een cervicale dislocatie
  11. Prepareer de longen en spieren uit de muis.
- Fixeer de longen in isopentanaan, vloeibare N<sub>2</sub> of gebufferde 4% formaldehyde

Aan

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*  
29-09-2011

**Project:** *De rol van spier GR-signalering in hypoxie-geïnduceerde spieratrofie.*

DEC-UM  
Voorzitter DEC-UM

**Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

p/a secretariaat DEC-UM

*Secretariaat DEC-UM*

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

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

*Postadres*  
Postbus 616  
6200 MD Maastricht

**Projectnummer:** 2011-126

**Diersoort:** muis

**Aantal dieren:** 58

**Einddatum:** 28-09-2015

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