

74

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-158

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 02-02-2012

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
06-02-2012	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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	3098.2246N
--------------	------------

Titel van het onderzoek:

De rol van miR- in leukocyten in virale myocarditis

startdatum 1 januari 2012

einddatum⁹ 1 januari 2016

Duur van de proef¹⁰ 7 dagen

	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.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art. 9	
5.				Art. 9	
6. PI (punt 6)				Art 12	

Diergroep	1-7	8-14	15			
ctrl/exp/sham	sham	Exp (VM)	Exp (donor)			
Diersoort	01	01	01			
Stam	C3H (C3H/HeNHsd)	C3H (C3H/HeNHsd)	C3H (C3H/HeNHsd)			
Construct / mutatie ?	geen	geen	geen			
Herkomst (leverancier) *	1	1	1			
Aantal	42	126	36			
Geslacht	M	M	M			
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	Ja			
Leeftijd/gewicht	4w	4w	6-8w			
Doel van de proef *	31	31	31			
Belang van de proef *	1	1	1			
Toxicologisch onderzoek *	1	1	1			
Bijzondere technieken *	1	1	1			
Anesthesie *	4	4	4			
Pijnbestrijding *	1	1	1			
Mate ongerief *	2	4	1			
Toestand dier einde exp*	1	1	1			

* 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 miR- in leukocyten in virale myocarditis".

1. Doel van de proef.

Het microRNA (miR) is een belangrijke regulator van cardiale ontsteking gedurende virale myocarditis (VM). Eerdere experimenten die wij in samenwerking met de Universiteit van Leuven hebben uitgevoerd tonen aan dat systemische remming van miR middels synthetische antimiRs de mate van necrose en ontsteking in het hart kan remmen in een muismodel van Cocksackievirus B3 geïnduceerde VM.

In de voorgestelde experimenten willen onderzoeken of het miR in leukocyten verantwoordelijk is voor de bescherming. Hiertoe willen wij macrofagen en T-cellen isoleren, in vitro transfecteren met miR- remmers en weer toedienen aan muizen met VM.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Virale myocarditis treft jaarlijks duizenden kinderen en jong volwassenen in Nederland. Het is een invaliderende ziekte met soms dramatische afloop in vaak voorheen gezonde personen tussen de 18 en 60 jaar.^{1,2} Tot 20% van alle gevallen van plotse dood bij adolescenten zijn het gevolg van myocarditis. Hiernaast kan in 70% van de gevallen van cardiomyopathie virus aanwezigheid in het hart worden aangetoond. In Nederland betekent dit 70.000 patiënten, waardoor virus aanwezigheid een belangrijke oorzaak kan zijn van chronisch hartfalen. Ongecontroleerde inflammatie is de belangrijkste reden voor cardiale schade en chronisch hartfalen na virale myocarditis, met weinig directe schade door het virus zelf. Om deze schade zoveel mogelijk te beperken is het belangrijk de onderliggende pathofysiologische mechanismen tijdens virale myocarditis duidelijk in kaart te brengen en hierop ingrijpende potentiële nieuwe behandel mogelijkheden op te sporen.

3. Alternatieven

Er bestaan geen in vitro experimenten die voldoende de interactie tussen de verschillende celtypen gedurende het verloop van VM kunnen simuleren om in vivo onderzoek te vervangen.

4. Ethische afweging

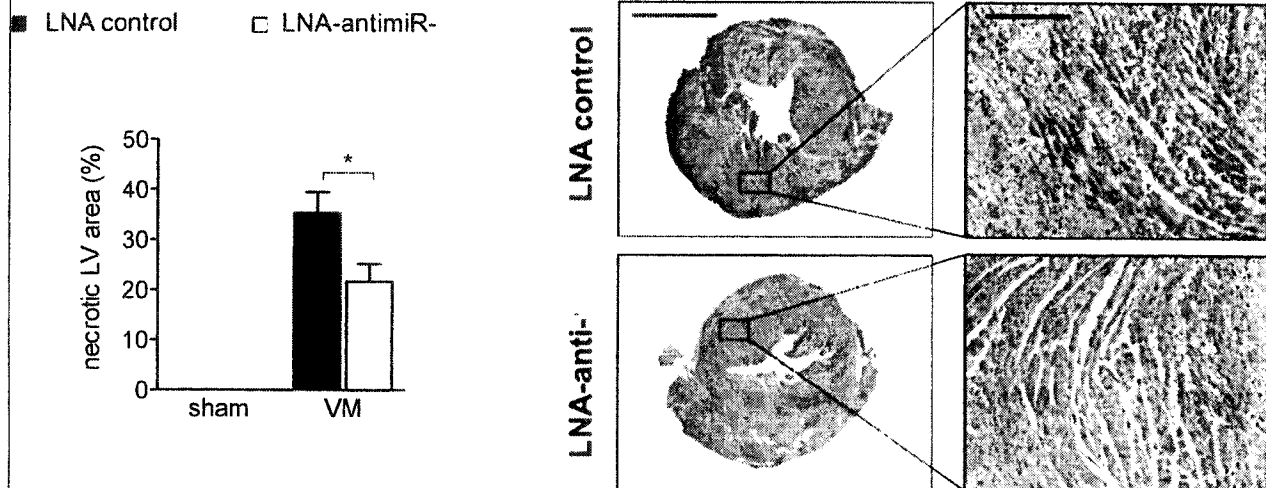
Er zijn nauwelijks behandelingen voor virale myocarditis. Nieuwe opties voor therapie kunnen leiden tot een betere prognose van virale myocarditis bij een relatief jonge, voorheen gezonde patiëntenpopulatie. Dit rechtvaardigt ons inziens het niet te onderschatten, ernstig ongerief van de te gebruiken proefdieren.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Het microRNA (miR) is een belangrijke regulator van ontsteking^{1, 2}. Pilot data uit ons lab (experimenten uitgevoerd in Leuven) tonen dat tijdens de cardiale ontsteking in virale myocarditis (VM) miR- ge-upreguleerd wordt en dat systemische remming van miR middels synthetische antimiRs de mate van necrose en ontsteking in het hart kan remmen in een muismodel van Cocksackievirus B3 geïnduceerde VM (zie figuur). Systemische toediening van het antimiRs geeft geen informatie over het celtype dat verantwoordelijk is voor dit fenotype. Omdat het bekend is dat miR- inhibitie het inflammatoire gedrag van T-cellen en macrofagen kan beïnvloeden hypothesiseren wij dat remming van miR- in macrofagen of T lymfocyten de bescherming door

systemische miR-remming na zal bootsen. Het voorgestelde experiment vormt een belangrijke aanvulling om onze bestaande data en is van belang voor de interpretatie ervan. Onze mening hierover wordt gedeeld door onze peer reviewers.



6. Wetenschappelijke beoordeling

Het project is extern wetenschappelijk beoordeeld en akkoord bevonden door de PI van de vakgroep aan deze Universiteit (zie voorblad).

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor de studie willen wij C3H muizen gebruiken van de firma Harlan omdat deze gevoelig zijn voor het CVB3 geïnduceerde VM model. Aan het eind van het experiment worden de muizen geëuthanaseerd voor gedetailleerde bestudering van de cardiale inflammatie.

7b. Sexe

Omdat vrouwtjes grotendeels beschermd zijn tegen dit VM model gebruiken wij 4w oude mannetjes. Ook voor donor muizen gebruiken wij enkel mannetjes, aangezien het is aangetoond dat vrouwtjes en mannetjes macrofagen zich verschillend gedragen in myocarditis en een van de redenen voor vrouwelijke bescherming zijn.³

7.c. Aantallen

Ons primaire eindpunt is cardiale necrose (gemeten als percentage infiltraat op een transversale HE gekleurde coupe).

Powerberekening:

Met de formule van L. Sachs: $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(z\alpha/2 - z\pi)^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$

Dus $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding (σ) wordt geschat op 50%. Deze variatie komt voort uit notoire verschillen tussen individuele muizen in dit model.

Het beoogde effect (d) wordt geschat op 50% (cardiale necrose).

Dit geeft; $n = 15,7 * (50/50)^2 = 15,7 * 1 = 16$ dieren per groep

Uitval is 10% (onvoorziene uitval en onvoorziene effecten transplantatie)

Dus; $(a-0,2a) = 16 \Rightarrow 0,8a = 16 \Rightarrow a = 18 \Rightarrow 18$ dieren per VM groep

In verband met kleinere variatie rekenen wij 6 dieren per sham groep.

Groep	Aantal dieren
1. sham + PBS	6
2. sham + macrofagen-onbehandeld	6
3. sham + macrofagen-anti-	6
4. sham + macrofagen-anti-scrambled	6
5. sham + T cellen-onbehandeld	6
6. sham + T cellen-anti-	6
7. sham + T cellen-anti-scrambled	6
8. VM + PBS	18
9. VM + macrofagen-onbehandeld	18
10. VM + macrofagen-anti-	18
11. VM + macrofagen-anti-scrambled	18
12. VM + T cellen-onbehandeld	18
13. VM + T cellen-anti-	18
14. VM + T cellen-anti-scrambled	18
Total	168

Daarnaast zullen we C3H muizen nodig hebben (de achtergrond moet gelijk zijn ivm mogelijk afstoting na celtransplantatie) om beenmergcellen (voor macrofagen) en thymus cellen (voor T cellen) uit te isoleren. Uit het beenmerg van 1 muis kunnen we ongeveer 10 miljoen macrofagen kweken, voldoende voor 2 muizen (we injecteren 5 miljoen cellen per muis, volgens een eerder beschreven studieopzet³). We verwachten voldoende T cellen uit deze muizen te verkrijgen dus we rekenen met het aantal benodigde muizen om de macrofagen te leveren. In totaal worden $18 + 54 = 72$ muizen met macrofagen behandeld, we hebben daarom 36 muizen nodig als donor. Deze muizen moeten iets ouder zijn zodat er uit het beenmerg meer cellen gehaald kunnen worden.

De laatste groep is daarom een leukocyten donor groep van 36 muizen C3H 6-8w.

Dierproef

8. Experiment

In het experiment zullen eerst leukocyten geïsoleerd worden uit donormuizen, middels cervicale dislocatie onder isofluraan. Hierna worden onmiddellijk de achterpoten verwijderd voor een beenmergisolatie en de thymus voor een T cel extractie. Deze cellen worden een ruime week gekweekt en gedifferentieerd in macrofagen (alle non-macropaag voorlopers gaan hierbij dood, daarom is de opbrengst lager dan bij injectie van alle stamcellen bij BMT experimenten) volgens standaard protocollen en in vitro behandeld met miR specifieke of controle remmers.

Deze cellen worden vervolgens geresuspendeerd in een klein volume: 5 miljoen cellen per 100 uL en in de staartvene geïnjecteerd worden van CVB3 geïnfecteerde muizen (infectie volgens ip inoculatie met virus in de DMII, dosis 0,2 ml van 10^7 CCID 50). Dit gebeurt op dag 3 na infectie (zoals eerder beschreven³). De muizen worden geëuthanaseerd op dag 7 na CVB3 infectie, omdat dit het maximum van de ontsteking is.

De volgende controle groepen worden geïncubeerd:

- geen toediening van leukocyten: dit geeft het effect van de cellen ten opzichten van een normale infectie aan
- toediening van niet getransfecteerde leukocyten: onmisbaar om eventuele aspecifieke effecten van transfectie te kunnen herkennen
- toediening van controle-getransfecteerde leukocyten: de belangrijkste controlegroep welke maar 1 variabele verschilt van de antimiR leukocyten groep.

Ons inziens zijn alle control groepen onmisbaar. Een onvolledig gecontroleerd experiment leidt immers vaak tot moeilijk te interpreteren resultaten en nieuwe experimenten en daarom slechts zelden tot effectieve vermindering van het aantal benodigde dieren.

Tenslotte: Alle metingen en kwantificaties vinden geblindeerd plaats.

Tijdschema:

Dag	0	3	7
Groep1-7 (sham)	niets	Iv injectie cellen	Euthanasie
Groep8-14 (CVB3)	Ip CVB3 infectie	Iv injectie cellen	Euthanasie

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De dieren worden geëuthanaseerd middels cervicale dislocatie isofluraan anesthesie.

9b. Pijnbestrijding

Voor de CVB3 injectie i.p. en staartvene injectie van leukocyten zal geen pijnbestrijding plaats vinden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De dieren worden geëuthanaseerd middels cervicale dislocatie isofluraan anesthesie.

Humane eindpunten

Deze omvatten:

- gewichtsverlies van >20%, apathie of tekenen van ernstige pijn, niet meer reageren op aanraken en prikkels.

- Abnormale bloedingen of zelf geïnduceerde verwondingen (deze vallen niet in de lijn der verwachting)

Indien een humaan eindpunt bereikt wordt, zal vooraf contact opgenomen worden met de VO, welke onderzoekt of het eerder beëindigen van het experiment mogelijk is. Indien dit niet mogelijk is zullen de dieren opgeofferd worden middels cervicale dislocatie. De proefdierdeskundige zal in ieder geval worden ingelicht bij enige vorm van calamiteiten

10a. Ongerief



C3H muizen gevoelig zijn voor het ontwikkelen van virale myocarditis maar in tegenstelling tot in C57Bl6 muizen leidt dit meestal niet tot ernstige systemisch ziek zijn en blijven de muizen veelal goed beweeglijk.

Groep 1-7: sham groepen, ondervinden enkel een eenmalige iv injectie van leukocyten. Ongerief schaal 2.

Groep 8-14: VM groepen, ondergaan een eenmalige ip inoculatie met CVB3 en 3 dagen later een eenmalige iv injectie van leukocyten. Ongerief schaal 4 ivm CVB3 infectie.

Groep 15: Donor groep, de dieren ondergaan geen behandeling voor euthanasie. Ongerief schaal 1.

10b. Welzijnsevaluatie

De ongeriefcodes is bijgesteld naar aanleiding van vorige studies (2009-062, inschatting code 5) omdat in deze studie alsmede in uitgebreide studies in Leuven weinig ongerief en gewichtsverlies werd geobserveerd.

11. Verzorging en huisvesting

Vindt plaats in de ruimte volgens de normen van de Centrale Proefdiervoorziening van de Universiteit Maastricht.

12. Deskundigheid

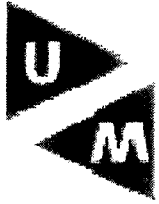
Alle ingrepen en procedures worden door daartoe bevoegde en bekwame personen uitgevoerd.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

nvt

Literatuur

1. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frendewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Suppran M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316:604-608
2. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316:608-611
3. Li K, Xu W, Guo Q, Jiang Z, Wang P, Yue Y, Xiong S. Differential macrophage polarization in male and female balb/c mice infected with coxsackievirus b3 defines susceptibility to viral myocarditis. *Circulation research*. 2009;105:353-364



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, 19-12-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*De rol van miR- in leukocyten in virale myocarditis*", is op de DEC vergadering van 16 december 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De DEC verzoekt de VM/GGO medewerker van het voorblad te verwijderen. GGO is niet van toepassing. Wanneer deze medewerker participeert in dit onderzoek, kan hij wel als overige uitvoerende vermeld worden op het voorblad.
- 2) Punt 6- De DEC verzoekt aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd.
- 3) De DEC merkt op dat het aantal van de donorgroep 36 moet zijn en verzoekt dit bij punt 7c en op het voorblad aan te passen.
- 4) In het tijdschema, bij punt 8, verzoekt de DEC "Groep 1-6", aan te passen "1-7".
- 5) Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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 2011-158, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

De DEC-UM wenst u en uw familie fijne feestdagen en een voorspoedig en vooral gezond 2012!

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Van:

Aan:

De Dier Experimentele Commissie,
Faculty of Health, Medicine and Life Sciences
Universiteit Maastricht

Betreft: Respons nav wijzigingsbrief project 2011-158-678

Maastricht, 04 januari 2012

Geachte heer, mevrouw,

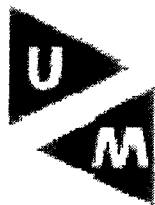
Bij dezen stuur ik u onze antwoorden op vragen van de DEC aangaande het onderzoeksvoorstel 2011-678, in de brief die wij 19 december jl ontvingen. Wij kunnen ons vinden in het commentaar en hebben het hieronder puntsgewijs beantwoord:

1. De medewerker is verwijderd
2. Externe beoordeling heeft plaatsgevonden en is vermeld.
3. Groepsgrootte is aangepast.
4. De aanpassing is doorgevoerd.
5. Het ongerief is beter aangegeven per groep.

De aangepaste versie van ons onderzoeksvoorstel is bijgevoegd.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Bij onvolkomenheden of vragen kunt u vanzelfsprekend te allen tijde contact met mij opnemen.

Hoogachtend,



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, 01-02-2012

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie van uw projectaanvraag: "*De rol van miR in leukocyten in virale myocarditis*", is op de DEC vergadering van 27 januari 2012 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag/opmerking:

- 1) De DEC merkt op dat de groepsgrootte niet overal in de tekst goed is aangepast en verzoekt dit alsnog te doen.

Opmerking: De DEC verzoekt in de toekomst, bij punt 10a, in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie per handeling en groep aan te geven en het totale ongerief te sommeren.

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 **2011-158**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



Van:

Aan:

De Dier Experimentele Commissie,
Faculty of Health, Medicine and Life Sciences
Universiteit Maastricht

Betreft: Respons nav Wijzigingsbrief project 2011-158-068

Maastricht, 04 januari 2012

Geachte heer, mevrouw,

Bij dezen stuur ik u ons antwoord op vraag van de DEC aangaande het onderzoeksvoorstel 2011-158, in de brief die wij 1 februari jl ontvingen. Wij kunnen ons vinden in het commentaar en hebben de groepsgrootte nu overal aangepast.

De aangepaste versie van ons onderzoeksvoorstel is bijgevoegd.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Bij onvolkomenheden of vragen kunt u vanzelfsprekend te allen tijde contact met mij opnemen.

Hoogachtend,

Aan _____

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043

Maastricht
13-02-2012

Project: *De rol van miR- in leukocyten in virale myocarditis.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM
"
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

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: 2011-158
Diersoort: muis
Aantal dieren: 204
Einddatum: 06-02-2016

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