

47

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-008

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 03-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
10-02-2011	Herz. Versie

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject	2.						
-------------	----	--	--	--	--	--	--

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

Budgetnummer	30982260N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

microRNA expressie verandering tijdens angiotensine infusie

startdatum 15-02-2011

einddatum⁹ 15-01-2014

Duur van de proef¹⁰: 1

mnd

	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.12	
				Art.9	
5. Principal investigator				Art.9	

Diergroep	1	2	3	4	5	.	.
ctrl/exp/sham	Sham	Exp	Exp	Exp	Exp		
Diersoort	01	01	01	01	01		
Stam	C57/BL6J	C57/BL6J	C57/BL6J	C57/BL6J	C57/BL6J		
Construct / mutatie ?	-	-	-	-	-		
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01		
Aantal	18	19	19	19	19		
Geslacht	man	man	man	man	man		
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja/nee ⁸	ja		
Leeftijd/gewicht	8 wk	8 wk	8 wk	8 wk	8 wk		
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 *	01	01	01	01	01		
Anesthesie *	04	04	04	04	04		
Pijnbestrijding *	01	04	04	04	04		
Mate ongerief *	04	04	04	04	04		
Toestand dier einde exp*	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: microRNA expressie verandering tijdens angiotensine infusie

1. Doel van de proef.

Hartweefsel is in staat om zich aan te passen aan veranderende hemodynamische omstandigheden, bijvoorbeeld een myocardiaal infarct, hoge bloeddruk, veel angiotensine II. Omdat hartspiercellen niet kunnen delen zijn de aanpassings-mogelijkheden beperkt tot hypertrofie. Cardiale hypertrofie, wanneer uitgelokt door pathologische omstandigheden, kan leiden tot hartfalen, een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit in onze Westerse samenleving.

MicroRNAs (miRs), kleine RNA moleculen die niet worden omgezet in eiwit, zijn onlangs gelinkt aan de pathogenese van hartfalen. In ons onderzoek zijn we geïnteresseerd in ontstekings-gerelateerde microRNAs.

Om een totaalbeeld te krijgen van alle inflammatie-gerelateerde microRNAs die in expressie veranderen tijdens de ontwikkeling van hartfalen willen wij een microRNA array uitvoeren na verschillende behandel-preioden met angiotensine II. Naast de verschillen in microRNA expressie in respons op angiotensine II, zal ook de contractiliteit van het hart na behandeling met angiotensine II gemeten worden.

Dit onderzoek valt binnen de interesses van het Heart Failure Research Center en is onafhankelijk positief beoordeeld door de Nederlandse Hartstichting.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Hartfalen is een progressieve en ernstig invaliderende aandoening met een slechte prognose waarvoor geen therapie beschikbaar is anders dan symptoombestrijding. Volgens statistieken van de Nederlandse Hartstichting leven er in Nederland zo'n 200.000 mensen met hartfalen. De helft van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose. Deze fundamentele studie zal bijdragen aan de opheldering van de mechanismen die leiden tot hartfalen, om op termijn te helpen voorkomen dat mensen hartfalen ontwikkelen. Dit is zowel sociaal als economisch van grote maatschappelijke relevantie.

3. Alternatieven

Het hart is een complex orgaan dat bestaat uit meerdere celtypen, waaronder ook cellen uit de bloedcirculatie, die alle hun eigen rol hebben in het proces dat tot hartfalen leidt. komt voor in meerdere van deze celtypen. Het is daarom cruciaal dat we het hart in vivo bestuderen om de rol van de ontwikkeling van hartfalen te bestuderen. Er zijn (nog) geen in vitro modellen die deze complexe processen kunnen nabootsen.

4. Ethische afweging

Hartfalen is doodsoorzaak nummer 1 in Nederland; jaarlijks overlijden meer dan 6.000 Nederlanders aan deze ziekte en dit aantal zal stijgen door de toename van risicofactoren als overgewicht en suikerziekte. De hedendaagse kennis over de cruciale factoren die tot hartfalen lijden schiet tekort. Dit proefdierexperiment zal bijdragen aan een beter begrip van de oorzaken van hartfalen, waardoor in de toekomst diagnose en therapie verbeterd kunnen worden. Hierin schuilt naar onze mening een rechtvaardiging voor het niet te onderschatten, matig/ernstig ongerief van de te gebruiken proefdieren.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De pathogenese van hartfalen is complex, en wordt gekenmerkt door vergroting van de hartspiercellen (hypertrofie), verhoogde afzetting van bindweefsel (fibrose) en ontsteking. Het is reeds bekend dat microRNAs hypertrofie en fibrose reguleren. Over de rol van microRNAs in ontsteking van het hart is nog weinig bekend. Onze recente studie, waarbij we hartfalen induceerden door angiotensine II toediening, toont aan dat

In het huidige onderzoek willen we nagaan welke andere microRNAs hun expressie patroon veranderen na angiotensine II-behandeling. Omdat we geïnteresseerd zijn in een breed scala aan microRNAs die relaties hebben tot inflammatie, hart falen, fibrose en cardiale hypertrofie, is het van belang dat we de microRNA expressie op meerdere tijdstippen meten. Hiervoor zullen we dieren na 4 dagen, 1 week, 2 weken en na 4 weken angiotensine II infusie onderzoeken. In de tabel 1 is aangegeven welke parameter op welk tijdstip het meest van invloed is.

AngII infusie	Inflammatie	Hypertrofie	Fibrose	Hart falen
4 dagen	+	-	-	-
1 week	++	+	-	-
2 weken	-	++	-	-
4 weken	-	+++	+	+

Vervolgens willen we in dezelfde muizen de mate van contractiliteit en relaxatie van de hartspier bepalen na angiotensine II-behandeling om te bevestigen dat de angiotensine behandeling inderdaad een hypertrofe remodellering tot stand heeft gebracht. Op basis van de resultaten van echocardiografie en dp/dt metingen uit het vorige experiment verwachten we dat de angiotensine II-behandelde muizen een verlaagde/verminderde contractiliteit en relaxatie laten zien ten opzichte van de muizen die niet met angiotensine zijn behandeld.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het huidige project is beoordeeld en akkoord bevonden door de PI van de vakgroep.

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor het onderzoek wordt gebruik gemaakt van C57BL6/J muizen afkomstig van Harlan, en van knockout muizen (met C57Bl/6J achtergrond) die momenteel in fok zijn bij de UM. De muizen zullen worden opgeofferd ten behoeve van het experiment.

7b. Sexe

De sexe-verschillen bij mannen en vrouwen met hartfalen zijn uitgebreid bekend doch nog maar gedeeltelijk verklaard. Om eventuele hormonale invloeden uit te sluiten wordt dan ook gebruik gemaakt van mannetjes muizen.

7.c. Aantallen

Steunend op onze ervaring, hebben we geleerd dat de variatie coefficient van het hartgewicht 20 % bedraagt en het te verwachten relatief effect, de toename van hartgewicht, 20 % is. Gewenste P waarde is < 0.05 en power 80%.

$$N = 15.7 \times ((0.2 \times 0.2) / (0.2 \times 0.2)) \\ = 15.7 \text{ dieren}$$

Angiotensine II-behandeling leidt tot een peri-operatieve en post-operatieve mortaliteit van ongeveer 15%; de canulatie van de arteria femoralis is niet geassocieerd met mortaliteit. Indien 15.7 dieren 85% beslaan van de totale groep, hebben we $(15.7/85) \times 100 = 18.47$ dieren, ofwel 19 dieren, nodig per groep (wild type C57Bl/6J en n knockout).

In de sham groepen wensen wij hetzelfde aantal overlevende muizen. Saline-behandeling leidt tot een peri-operatieve mortaliteit van 10%, maar is niet geassocieerd met post-operatieve mortaliteit. Daarom zal elke sham-groep bestaan uit $(15.7/90) \times 100 = 17.4$ dieren, ofwel 18 dieren.

Groep	Aantal dieren
1. C57Bl/6J sham	18
2. C57Bl/6J AngII 4 dagen	19
3. C57Bl/6J AngII 1 week	19
4. C57Bl/6J AngII 2 weken	19
5. C57Bl/6J AngII 4 weken	19
Totaal	94

Dierproef

8. Experiment

De volgende experimenten zullen worden uitgevoerd.

Angiotensine II of fysiologisch zout infusie met subcutane minipomp. Dit zal gebeuren volgens Far-03-M gedurende 4 weken. Een Alzet mini-osmotische pomp, model 2004, 28 dagen zal worden geïmplanteerd. Uit ervaring weten we dat een dosis van 2.5 mg/kg/dag angiotensine II hoge bloeddruk, linker ventrikel hypertrofie en hartfalen veroorzaakt in C57Bl/6J muizen.

Echocardiografie. Dit zal gebeuren volgens Far-02-M.

Terminale hemodynamische characterisatie van de muis (dP/dt). Dit zal gebeuren volgens Far-07-M

Flowchart:

	Dag -1	Dag 0	Dag 4	Dag 7	Dag 14	Dag 28
Groep 1 <i>sham</i>	Echocardio baseline	Basisgewicht+ echo +dp/dt+ Euthanasie		-	-	-
Groep 2 4 dagen AnII	Echocardio baseline	Basisgewicht en Minipomp implantatie	Gewicht+ Echo+ dp/dt+ Euthanasie	-	-	-
Groep 3 7 dagen AnII	Echocardio baseline	Basisgewicht en Minipomp implantatie	Gewicht	Gewicht+ Echo+ dp/dt+ Euthanasie	-	-
Groep 4 14 dagen AnII	Echocardio baseline	Basisgewicht en Minipomp implantatie	Gewicht	Gewicht	Gewicht+ Echo+ dp/dt+ Euthanasie	-
Groep 5 28 dagen AnII	Echocardio baseline	Basisgewicht en Minipomp implantatie	Gewicht	Gewicht	Gewicht	Gewicht+ Echo+ dp/dt+ Euthanasie

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor de minipomp implantatie en echocardiografie worden de muizen eenmalig met 3-4 % isofluraan onder anaesthesie gebracht, waarna deze wordt onderhouden met 1.5-2.5 % isofluraan, zoals ook beschreven in SOPs 03M en 02M, resp.

Voor de Dp/Dt bloeddrukmeting zal gebruik gemaakt worden van SOP 07M, waarna de muizen geofferd worden door verbloeding via de aorta.

9b. Pijnbestrijding

Pre-operatieve pijnbestrijding: Voor de experimenten waarbij muizen wakker worden (minipompimplantatie), Post-operatief na de pompimplantatie wordt subcutaan eenmalig carprofen 2.5 mg/kg toegediend.

Bij opoffering zal de muis onder volledige anesthesie gebracht worden met isofluraan.

Antimicrobiële profylaxe: wordt bij geen van de hier toegepaste chirurgische ingrepen gegeven. De hier toegepaste chirurgische ingrepen worden onder steriele omstandigheden uitgevoerd, waardoor de wondgenezing normaal verloopt en er geen (zichtbare) aanwijzingen voor het ontstaan van (wond) infecties zijn.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Na afloop van het experiment wordt het dier onder urethaan narcose opgeofferd voor perfusie-fixatie. In geval van het voortijdig doden van betrokken proefdieren op basis van onderstaande criteria (humane eindpunten) worden de dieren opgeofferd middels pentobarbital (i.p. overdosis met 200mg/kg).

Humane eindpunten

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- Symptomen van benauwdheid, oedeem vorming, vertoning van cyanose, achteruitgaan van de lichaamsconditie, oncontroleerbare bloedingen, apathie, gewichtsverlies (25% tov begin gewicht) of ernstige infectie van de incisie op de plaats van pomp impantatie.

De proefdierdeskundige wordt ingelicht bij calamiteiten

10a. Ongerief



De dieren zullen in totaal 2 keer onder narcose gebracht worden; 1x voor minipompimplantatie en echocardiografie, en 1x voor de eind metingen, alvorens zij opgeofferd worden. Bij de minipomp implantatie zal de muis pijnbestrijding krijgen (zie hfdst. 9). De tijdsduur van de proef zal 0, 4, 7, 14 of 28 dagen zijn, afhankelijk van de experimentele groep.

	Ongerief narcose (dag 0)	Ongerief pomp implantatie (dag 0)	Ongerief Narcose (dag eindmeting)	<u>Totaal geschat ongerief</u>
Groep 1 (sham)	3	3	3	4
Groep 2 (4 dagen AngII infusie)	3	3	3	4
Groep 3 (7 dagen AngII infusie)	3	3	3	4
Groep 4 (14 dagen AngII infusie)	3	3	3	4
Groep 5 (28 dagen AngII infusie)	3	3	3	4

Het ongerief wordt gesteld op matig/ernstig (4), omdat de dieren twee keer onder narcose zullen worden gebracht.

10b. Welzijnsevaluatie

Angiotensine II infusie heeft geen zichtbare invloed op het welzijn van muizen met deze genetische achtergrond. De verkoever kamer maakt dat de dieren niet veel energie aan het handhaven van een goede lichaamstemperatuur hoeven te besteden. 30 graden is thermoneutraal voor de muis.

Speciale aandacht gaat uit naar symptomen van hartfalen zoals oedeem, gewichtsverlies en benauwdheid. Verder zal ook de incisie die nodig is voor de minipomp implantatie nauwkeurig gecontroleerd worden op infecties.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden gehuisvest binnen het CPV en op de dag van het experiment zullen ze worden vervoerd naar de laboratoria op de 4^{de} verdieping. Voer en dergelijke zijn standaard en gedurende het verblijf in het CPV zullen de muizen conform dagelijkse praktijk verzorgd worden door de medewerkers van het CPV. Voor de zorg gedurende de experimentdagen zullen wij de verantwoordelijkheid dragen. Bij calamiteiten dient (VO) gewaarschuwd te worden.

12. Deskundigheid

De operaties (minipomp implantatie en eindecho) worden door de art. 12 functionaris gedaan,

die uitgebreide ervaring heeft in het uitvoeren van deze operaties en met echocardiografie. De VO heeft 1 jaar ervaring in het doen van experimenten met muizen. Tevens heeft hij uitgebreide ervaring in de echocardiografie.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De volgende SOP's zullen worden gebruikt:

Echocardio muis: []

Implantatie van Alzet osmotische minipompjes bij de muis: []

Dp/Dt bloeddrukmeting: []

Relevante literatuur

geen

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
 Postbus 616
 NL-6200 MD Maastricht
 Telefoon: 043

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: “*MicroRNA expressie verandering tijdens angiotensine infusie*”, is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de PI met naam op het voorblad te vermelden en bij punt 6 het woordje “onafhankelijk” te verwijderen.
- 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 per groep aan te geven. Het leven met een minipomp dient ook bij het ongerief vermeld te worden. De DEC merkt nog op dat ze canulatie niet in het experiment terug heeft kunnen vinden?
- De DEC verzoekt de art.12 functionaris op het voorblad te vermelden.

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 **2011-008**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Geachte DEC,

Het project "*MicroRNA expressie verandering tijdens angiotensine infusie*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken. In deze vergadering zijn een aantal vragen naar voren gekomen welke hieronder zijn beantwoord. Ook het DEC protocol is aangepast.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de PI met naam op het voorblad te vermelden en bij punt 6 het woordje "onafhankelijk" te verwijderen.

Dit is aangepast in de herziene versie.

- 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 per groep aan te geven. Het leven met een minipomp dient ook bij het ongerief vermeld te worden. De DEC merkt nog op dat ze canulatie niet in het experiment terug heeft kunnen vinden?

Deze tabel is toegevoegd aan de herziene versie.

- De DEC verzoekt de art.12 functionaris op het voorblad te vermelden.

De art.12 functionaris is toegevoegd in de herziene versie.

Met vriendelijke groet,

Aan

Ons kenmerk 1 *Doorkiesnummer* *Maastricht*
14-02-2011

Project: *MicroRNA expressie verandering tijdens angiotensine infusie.*

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: 2011-008

Postadres

Diersoort: muis

Postbus 616

Aantal dieren: 94

6200 MD Maastricht

Einddatum: 10-02-2015

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

Vice-Voorzitter DEC-UM