

140

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-090

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 31-08-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
31-08-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGO NR ³ nvt

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	3098.2245N
--------------	------------

Titel van het onderzoek:

Welke ontstekingscellen spelen een rol bij de ontwikkeling van hartfalen na hoge bloeddruk of een virus-infectie?

startdatum 1 juli 2011

einddatum 9 1 juli 2015

Duur van de proef¹⁰: 28 dagen (groep 1-4); 35 dagen (groep 5-14)

	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	
4. overige uitvoerenden	Artikel 12 functionaris			Art.12	
5.				Art.9	
6.	(PI)			Art.9	
7.				Art.9	
8.				Art.9	

Diergroep	1	2-3	4	5	6-8	9	10	11-13	14
ctrl/exp/sham	sham	exp	exp	sham	exp	exp	sham	exp	exp
Diersoort	muis	muis	muis	muis	muis	muis	muis	muis	muis
Stam	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	C3H	C3H	C3H	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6
Construct / mutatie ?	wildtype	wildtype	wildtype	wildtype	wildtype	wildtype	wildtype	wildtype	wildtype
Herkomst (leverancier) *	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Aantal	18	38	19	16	60	20	16	60	20
Geslacht	m	m	m	m	m	m	m	m	M
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Leeftijd/gewicht	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn	6-12 wkn
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	31	31	31	31
Belang van de proef *	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Toxicologisch onderzoek *	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bijzondere technieken *	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Anesthesie *	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Pijnbestrijding *	4	4	4	1	1	1	1	1	1
Mate ongerief *	3	3	4	2	3	4	2	3	4
Toestand dier einde exp*	1	1	1	1	1	1	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: Welke spelen een rol bij de ontwikkeling van hartfalen na hoge bloeddruk of een virus-infectie?

1. Doel van de proef.

Hartfalen is een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit in onze Westerse samenleving. Hartfalen kan veroorzaakt worden door hoge bloeddruk, een myocard infarct, of een virale infectie. Deze oorzaken hebben 1 gemeenschappelijk facet: ze veroorzaken Het is nog niet bekend welke precies tijdens elk stadium van hartfalen aanwezig zijn, en het is ook onbekend op welke manier hun genexpressie profielen bijdragen aan de ontwikkeling van hartfalen. Daarom willen we in verschillende vormen van hartfalen in detail de aanwezigheid van verschillende celtypen in het hart gaan bekijken, waarna we de celtypen individueel opwerken voor het bepalen van hun genexpressiepatronen. Op die manier brengen we in kaart welke cellen actief bijdragen aan de ontwikkeling van hartfalen, en welke processen in die cellen daaraan bijdragen. Samenvattend heeft deze studie twee doelen:

- 1) In kaart brengen van en -aantallen in stadia van hartfalen na virus infectie en hoge bloeddruk.
- 2) In kaart brengen van genexpressieprofielen e.

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 en dynamisch 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. De interacties tussen de celtypen bepalen hun functie. 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 tot matig/ernstig ongerief van de te gebruiken proefdieren.

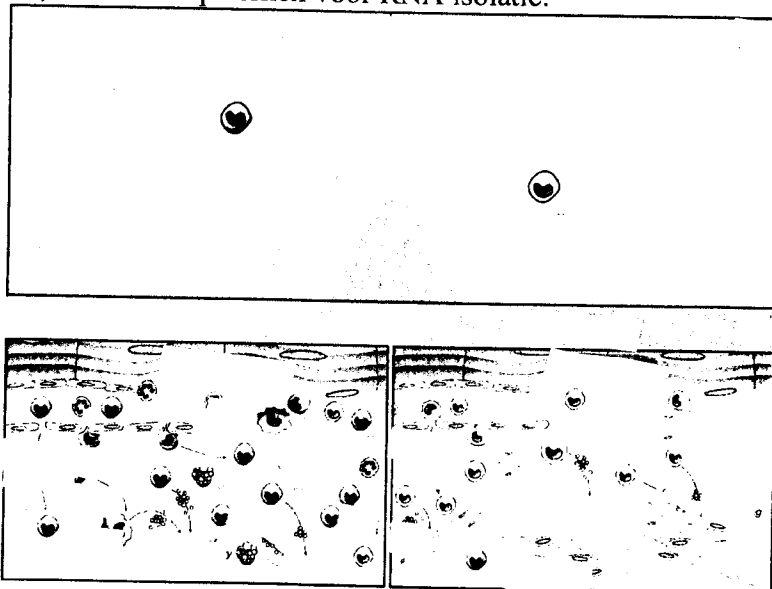
2 Wetenschap

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.

Echter, hoewel bekend is dat ook tijdens hartfalen veroorzaakt door een virus of hoge bloeddruk een rol speelt, is de precieze identiteit van de

– in verschillende stadia van deze vormen van hartfalen nog niet in kaart gebracht. Het eerste doel van deze studie is daarom het identificeren en kwantificeren van een virale infectie en na hoge bloeddruk. Het tweede doel van de studie is het genereren van genexpressieprofielen van de aanwezige, en zo de activiteit van deze cellen en hun bijdrage aan de ontwikkeling van hartfalen beter te begrijpen. De methode van kwantitatieve uit hartspier is intussen geoptimaliseerd in samenwerking met de afdeling pathologie. We zijn in staat om alle celsoorten uit het hart te isoleren, en we kunnen de met behulp van fluorescente analyse en cell sorting (FACS) categoriseren en kwantificeren, en daarna opwerken voor RNA isolatie.



Figuur 1:
Nahrendorf
et al.
Circulation
2010
(review).

Deze studie maakt gebruik van twee muizen modellen van hartfalen:

- 1) virale myocarditis in de muis. In muizen met een C3H achtergrond leidt een eenmalige injectie met Coxsackievirus B3 (CVB3) binnen 1 week tot en na 5 weken tot hartfalen, terwijl muizen met een C57Bl/6 achtergrond minder 1 geen hartfalen ontwikkelen. De reden voor dit verschil in gevoeligheid is onbekend en ligt mogelijk in een verschil in (waarover deze studie meer duidelijkheid kan geven).
- 2) hoge bloeddruk in de muis geïnduceerd door angiotensine II. In muizen met een C57Bl/6 achtergrond leidt een dosis van 2,5 mg/kg/dag na 1 week tot , na 2 weken tot gecompenseerde hypertrofie, en na 4 weken tot hartfalen.

Op basis van deze modellen en gegevens stellen we voor:

- 1) cellen te isoleren uit harten met virale myocarditis op 0 dagen, 4 dagen, 1, 2, en 5 weken na injectie.
- 2) cellen te isoleren uit harten na angiotensine II behandeling gedurende 0, 1, 2 en 4 weken.

Gedetailleerde onderbouwing tijdstippen:

1) Virale myocarditis

	0	4 dagen	1 week	2 weken	5 weken
C57Bl/6	controle				
C3H	controle				

en

2) Angiotensine II

	0	1 week	2 weken	4 weken
C57Bl/6	controle			

6. Wetenschappelijke beoordeling

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

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor het onderzoek wordt gebruik gemaakt van C3H en C57Bl/6 muizen afkomstig van Harlan. 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

De uitkomstmaat na 1, 2 en 4 weken angiotensine II behandeling is het hartgewicht, dat vanaf 1 week al gestegen is in de AngII groepen ten op zichte van de sham groepen, en maximaal is na 4 weken AngII. De uitleesparameter voor CVB3 infectie is de histologisch te bepalen aanwezigheid van na 4 dagen, 1 en 2 weken CVB3, en van fibrose na 5 weken CVB3.

Steunend op onze ervaring, hebben we geleerd dat de variatie coëfficiënt 20 % bedraagt en het te verwachten relatief effect 20 % is voor zowel Angiotensine II als CVB3 behandeling. 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%. 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 (behandelduur).

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**.

CVB3 infectie leidt bij C3H en C57Bl/6 muizen tot een mortaliteit in de acute fase (eerste week) van ongeveer 20%. Indien 15.7 dieren 80% beslaan van de totale groep, hebben we $(15.7/80) \times 100 = 19.6$ dieren, ofwel **20 dieren**, nodig per groep.

In de sham groepen verwachten we geen uitval, daarom zal elke sham-groep bestaan uit 15.7, ofwel **16 dieren**.

Groep	Aantal dieren	
1. C57Bl/6 sham	18	
2. C57Bl/6 AngII 1 week	19	
3. C57Bl/6 AngII 2 weken	19	
4. C57Bl/6 AngII 4 weken	19	75
5. C3H sham	16	
6. C3H + CVB3 4 dagen	20	
7. C3H + CVB3 1 week	20	
8. C3H + CVB3 2 weken	20	
9. C3H + CVB3 5 weken	20	
10. C57Bl/6 sham	16	
11. C57Bl/6 + CVB3 4 dagen	20	
12. C57Bl/6 + CVB3 1 week	20	
13. C57Bl/6 + CVB3 2 weken	20	
14. C57Bl/6 + CVB3 5 weken	20	192
Totaal	267	

5 Dierproef

8. Experiment

De volgende experimenten zullen worden uitgevoerd.

Groep 1-4: Angiotensine II of fysiologisch zout infusie met subcutane minipomp. Dit zal gebeuren volgens SOP 03M gedurende 1, 2 en 4 weken. Uit ervaring weten we dat een dosis van 2.5 mg/kg/dag angiotensine II hoge bloeddruk en linker ventrikel ontsteking, hypertrofie en hartfalen veroorzaakt in C57Bl/6 muizen.

Groep 5-14: CVB3 injectie. Hiertoe wordt de muis kort gefixeerd en wordt intraperitoneaal maximaal 200µl virus of saline toegediend. Er is gekozen om het virus IP toe te dienen omdat het eenvoudig toe te dienen is, en het virus zo de kans krijgt zich eerst te vermenigvuldigen in het maagdarmkanaal, zoals dit in klinische settings ook gebeurt.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor de minipomp implantatie worden de muizen in groepen 1-4 eenmalig met 3-4 % isofluraan onder anaesthesie gebracht, waarna deze wordt onderhouden met 1.5-2.5 % isofluraan, zoals ook beschreven in SOP 03M.

Groepen 5-14 ondergaan geen handelingen waarvoor anesthesie nodig is.

9b. Pijnbestrijding

Enkel toepasbaar voor groep 1-4.

Pre-operatieve pijnbestrijding: Bij minipompimplantatie ontvangen de muizen eenmalig de NSAID carprofen 2.5 mg/kg sc ter pijstilling. Bij uiteindelijke opoffering zal de muis onder volledige anesthesie gebracht worden met urethaan.

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

De dieren worden opgeofferd middels pentobarbital (i.p. overdosis met 200mg/kg) aan het einde van het experiment of bij het bereiken van humane eindpunten.

De symptomen van CVB3 infectie kunnen zijn: lethargie, gewichtsverlies en "ruffled skin". Als aanwezig hebben deze symptomen hun hoogtepunt tussen dag 6 en 8 na infectie. Hartfalen ten gevolge van CVB3-behandeling na de acute fase of angiotensine II-behandeling kan gepaard gaan met moeilijk ademen en apathie. Indien deze symptomen een ernstige vorm aannemen dienen de muizen te worden ge-euthaniseerd.

Humane eindpunten

De dieren zullen intensief gemonitord worden (dagelijks) en voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren. Bijv. zelf geïnduceerd trauma, abnormale houding of beweging, open wonden of zweren, ernstige of continue respiratoir ongerief i.h.b hoesten, niezen, neusbloedingen, tachypnoe, moeilijk ademen
- apathie, gewichtsverlies (25% tov begin gewicht)

De proefdierdeskundige wordt ingelicht bij calamiteiten.

10a. Ongerief



In de tabel staat per groep de handelingen die de dieren ondergaan en het geschatte ongerief van deze handelingen; in de rechtse kolom word een inschatting gemaakt van het totale ongerief.

Groep *	Ongerief Minipomp-implantatie	Ongerief Virus injectie 1x (dag 0)	Ongerief Leven met hartfalen	Ongerief narcose opofferen	Totaal ongerief
1. C57Bl/6 sham (4 weken)	03	x	x	02	03
2. C57Bl/6 AngII 1 week	03	x	03	02	03
3. C57Bl/6 AngII 2 weken	03	x	03	02	03
4. C57Bl/6 AngII 4 weken	03	x	04	02	04
5. C3H sham (5 weken)	x	x	x	02	02
6. C3H + CVB3 4 dagen	x	02	03	02	03
7. C3H + CVB3 1 week	x	02	03	02	03
8. C3H + CVB3 2 weken	x	02	03	02	03
9. C3H + CVB3 5 weken	x	02	04	02	04
10. C57Bl/6 sham (5 weken)	x	x	x	02	02
11. C57Bl/6 + CVB3 4 dagen	x	02	03	02	03
12. C57Bl/6 + CVB3 1 week	x	02	03	02	03
13. C57Bl/6 + CVB3 2 weken	x	02	03	02	03
14. C57Bl/6 + CVB3 5 weken	x	02	03	02	04

* als een groep een handeling niet ondergaat is het gemarkeerd in de tabel met (x)

10b. Welzijnsevaluatie

De dieren worden intensief gemonitord (dagelijks). De symptomen beschreven in punt 9c zijn zeldzaam. Angiotensine II infusie heeft meestal geen zichtbare invloed op het welzijn van muizen met deze genetische achtergrond. CVB3 infectie kan leiden tot ziekte in C3H en C57Bl/6 muizen, maar uit eerdere proeven blijkt dat CVB3 infectie weinig zichtbare invloed heeft op het welzijn van muizen met deze genetisch achtergronden. 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.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren worden in groepsverband gehuisvest en verzorging vindt plaats conform de normen van de Centrale Proefdier Voorzieningen Maastricht. 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. Bij calamiteiten dient de VO of VVO gewaarschuwd te worden.

Angiotensine II-behandeling (groepen 1-4): De muizen worden gehuisvest binnen het CPV, experimentele gang, en op de dag van minipompimplantatie en opoffering zullen ze worden vervoerd naar de laboratoria op de 4^{de} verdieping. Voor de zorg gedurende de experimentdagen zullen wij de verantwoordelijkheid dragen.

CVB3-behandeling (groepen 5-12): De muizen worden binnen het CPV in een gehuisvest en opgeofferd.

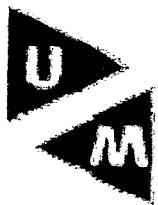
12. Deskundigheid

De minipomp implantaties en intraperitoneale injecties worden door de art. 12 functionaris gedaan, die uitgebreide ervaring heeft in het uitvoeren van deze handelingen. De VO heeft 4 jaar ervaring in het doen van experimenten met muizen.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De volgende SOP wordt gebruikt:

Implantatie van Alzet osmotische minipompjes bij de muis: 03M



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 29-06-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Welke spelen een rol bij de ontwikkeling van hartfalen na hoge bloeddruk of een virus-infectie?*", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de PI op het voorblad te vermelden.
- Bij punt 7c verzoekt de DEC de typefout te corrigeren van "15.7.90" in "15.7/80".
- Bij punt 7c mist de DEC de uitleesparameter. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC wenst een onderbouwing voor de verschillende tijdstippen.
- De DEC vindt het uitvalspercentage van de shamgroep vrij hoog ingeschat en verzoekt dit te motiveren.

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 **2011-090**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 15 augustus 2011

Betreft: DEC 2011-090

Geachte DEC,

Middels deze brief wil ik graag Uw vragen beantwoorden met betrekking tot project 2011-090, "Welke spelen een rol bij de ontwikkeling van hartfalen na hoge bloeddruk of een virus-infectie?". De aanpassingen zijn grijs gemarkeerd op het voorblad en in de aanvraag zelf.

- De PI is toegevoegd aan het voorblad. Ook is een nieuwe medewerker toegevoegd
Zijn art.9 bevoegdheid is aangevraagd.
- Bij punt 7c is de typefout gecorrigeerd van "15.7/90" in "15.7/80".
- Bij punt 7c zijn de uitleesparameters toegevoegd voor de AngII en CVB3 behandelingen.
- De tijdstippen zijn bij punt 5 onderbouwd in een tabel.
- De uitval in de sham groepen bij de Angiotensine II experimenten wordt veroorzaakt door de verdoving bij de minipompimplantatie.

Ik hoop hiermee Uw vragen naar voldoening te hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet.

Aan: .

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
05-09-2011

Project: *Welke ontstekingscellen spelen een rol bij de ontwikkeling van hartfalen na hoge bloeddruk of een virus-infectie.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

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: 2011-090

Diersoort: muis

Aantal dieren: 267

Einddatum: 31-08-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM