

147

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-125

Ontvangen: 17-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
19-10-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR³

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	30 98 1119 B
--------------	--------------

Titel van het onderzoek:

Verzamelen van muis plasma voor ontwikkeling en validatie analyse technieken

startdatum Oktober 2011

einddatum ⁹ Oktober 2014

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)				nl Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art.12 Art.9	
5.PI/punt 6					

Diergroep	1	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham						
Diersoort	Muis					
Stam	Geen voorkeur					
Construct / mutatie ?						
Herkomst (leverancier) *	01 CPV, UM					
Aantal	250					
Geslacht	m/v					
Dieren immuuncompetent ?	ja/nee ⁸					
Leeftijd/gewicht	n.v.t.					
Doel van de proef *	37					
Belang van de proef *	01					
Toxicologisch onderzoek *	01					
Bijzondere technieken *	01					
Anesthesie *	04					
Pijnbestrijding *	01					
Mate ongerief *	02					
Toestand dier einde exp*	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: Verzamelen van muis plasma voor ontwikkeling en validatie analyse technieken.

1. Doel van de proef

Binnen het wordt met behulp van diverse modellen (laes en brein ischemie, LPS geïnduceerde ontsteking, atherosclerose) de relatie tussen bloedstolling en ontsteking onderzocht, alsmede de mogelijk gunstige effecten van antistolling op het reduceren van weefselschade ten gevolge van ischemie en verminderen van atherosclerose. In alle experimenten wordt gebruik gemaakt van muizen (met name C57Black/6J) en voor een betere analyse zijn nieuwe technieken nodig, specifiek voor muis plasma. In het bijzonder zijn we bezig met het ontwikkelen van ELISA technieken voor het bepalen van bloedstolling en ontsteking gerelateerde eiwitten in muisplasma en willen met behulp van de CAT methode de trombine generatie in muisplasma bepalen. Aangezien het hier mede bepalingen voor stollingsfactoren betreft geven aanvragers de voorkeur aan een eigen bloedafname techniek (zoals ook gebruikt in DEC 2007-088). Hierbij wordt 3.2 mM citraat (volume is 13 % lichaamsgewicht) i.v. toegediend via de vena cava. Na 15 seconden wordt bloed verzameld (max. 1.2 ml, eigen ervaring) en direct verwerkt tot plasma. Voordeel van deze methode is dat geen stollingsactivatie optreedt, zoals wel wordt waargenomen bij andere methoden¹. Voor de duidelijkheid: activatie van de bloedstolling kan bepalingen van stollingsfactoren sterk beïnvloeden.

Doel: Verzamelen van muisplasma volgens eigen protocol

Het verzamelde plasma zal gebruikt worden voor het opzetten en valideren van nieuwe technieken.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Door het opzetten van nieuwe bepalingmethoden kunnen reeds bestaande plasma monsters worden geanalyseerd en is er een betere interpretatie van de resultaten mogelijk. Uiteindelijk zal een betere kennis en begrip van de relatie tussen stolling en ontsteking leiden tot inzet van bestaande (of nieuwe) antistollingsmiddelen om de nadelige gevolgen van o.a. hart- en herseninfarct, atherosclerose en sepsis te verminderen en zo de gezondheid cq. kwaliteit van leven te verbeteren.

3. Alternatieven

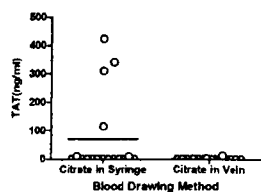
De eerdere en huidige diermodellen kunnen niet worden uitgevoerd in mensen of m.b.v. celculturen. Analyse van muisplasma verloopt in het algemeen anders dan humaan plasma (verschil in specificiteit antilichamen en enzymen).

4. Ethische afweging

Gezien het belang van de nieuwe technieken voor het bestuderen van het effect van therapieën in muismodellen voor bv. myocard infarct als atherosclerose, vinden de onderzoekers het ethisch verantwoord deze proeven uit te voeren. De dieren zullen meteen tijdens de bloedafname geëuthanaseerd worden waardoor het ongerief beperkt is. De onderzoekers verzoeken verder ook gebruik te mogen maken van overcomplete muizen. Er zijn dus geen nieuwe experimentele dieren nodig.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Het eindpunt van de bloedstolling is de omzetting van fibrinogeen naar het onoplosbare fibrine met als hoofddoel het dichtn van een wond. Het centrale enzym hierin is trombine, dat een aantal functies heeft waaronder de activatie van andere stollings-eiwitten alsmede ook de activering van de endotheel receptor PAR-1 die een functie heeft in cellulaire processen zoals celdeling, migratie, ontsteking en apoptose. Stollingsfactoren, zoals trombine, zijn dus mogelijk betrokken bij regulatie van cellulaire processen, naast hun functie in de bloedstolling. Uit eerdere onderzoeken volgt dat remming van stollingsfactor VII/VIIa leidt tot een afname in infarct grootte bij muizen² en geactiveerd proteïne C de mortaliteit bij sepsis en ischemische stroke reduceert^{3,4}. Data uit deze onderzoeken suggereert dat remming van de bloedstollings activatie de relatie tussen stolling en ontsteking in positieve zin beïnvloed, dat wil zeggen: verminderde activatie van de bloedstolling resulteert in een afname aan ontsteking en dus in verminderde weefselschade. Kennis en begrip van de relatie tussen stolling en ontsteking is noodzakelijk om pathologische processen als hart- en herseninfarct, atherosclerose en sepsis te remmen door middel van specifieke antistollingsmiddelen en zo het herstel na aandoening en de kwaliteit van leven te verbeteren. Voor het onderzoek naar de relatie tussen stolling en ontsteking wordt naast humane modellen ook gebruik gemaakt van muismodellen. Bepalingen voor concentraties en activiteiten van stollingsfactoren en ontstekingsgerelateerde eiwitten maken gebruik van antilichamen specifiek gericht tegen humane eiwitten en humane/bovine factoren specifiek voor humane enzymen. Daarnaast is het analyse volume redelijk groot. Voor bepaling van concentraties en activiteiten in muis plasma zijn nieuwe technieken nodig gericht op muis eiwitten en is een reductie van het analyse volume gewenst (meer analyses mogelijk binnen één dier). In het bijzonder zijn we bezig met het ontwikkelen van ELISA technieken voor het bepalen van een aantal eiwitten in muisplasma waaronder geactiveerd proteïne C en interleukines om een beeld te krijgen van ontsteking en stolling en willen met behulp van de CAT methode de trombine generatie in muisplasma bepalen. Met behulp van het plasma verkregen uit de muizen van DEC 2007-088, hebben we al een start kunnen maken voor het ontwikkelen van deze technieken. Zo kunnen we al een aantal interleukines in muis plasma meten, maar meer plasma is nodig voor het ontwikkelen van andere technieken alsmede het valideren van deze metingen. Aangezien de activiteit van enzymen wordt bepaald is het absoluut noodzakelijk dat de stolling niet wordt geactiveerd tijdens bloedafname. "Normale" bloedafname (citraat als antistolling in de spuit, of via capillair) bij muizen kan resulteren in activatie van de stolling door enerzijds contactactivatie en anderzijds door het vrijkomen van tissue factor. Dit werd in een eerder experiment aangetoond door bepaling van het trombine-antitrombine complex als maat voor stollingsactivatie. Door de bloedafname procedure te veranderen naar het inspuiten van citraat via de vena cava wordt stollingsactivatie voorkomen (zie figuur, de exacte procedure staat verderop beschreven en in 1). Om deze reden vragen wij om de afname procedure zelf uit te voeren.



aan de alternatieve procedure.

Figuur: Bloedafname door bloed op te nemen in een spuit waar citraat in zit resulteerde in stollingsactivatie bij 4 muizen (TAT waarde boven de 14 ng/ml). Afname door eerst citraat i.v. toe te dienen via de vena cava leidde niet tot stollingsactivatie. Duidelijk is dat stollingsactivatie op de "normale" manier niet altijd optreedt. Dit is echter vooraf niet aan te geven en daarom wordt de voorkeur gegeven

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is gelezen en goed bevonden door de

7. Proefdier keuze**7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming**

Muis: geen voorkeur voor stam

Herkomst: CPV, UM: overcomplete dieren --> geen nieuwe dieren

Wat is de uiteindelijke bestemming van het dier na de proef? Euthanasie

7b. Sexe

Geen voorkeur voor geslacht, volwassen dieren

7c. Aantallen

Muis:

Totaal: 250

De gegeven aantallen zijn een schatting gemaakt op basis van de te ontwikkelen technieken en zijn niet wetenschappelijk onderbouwd. Voor het ontwikkelen en valideren van bv een ELISA techniek of de trombine generatie assay, hebben we berekend dat we een totaal volume van 10 ml muisplasma nodig hebben. Met behulp van de 250 aangevraagde muizen, kunnen we dan een 12 tal nieuwe technieken ontwikkelen. Deze gegeven zijn een schatting en kunnen afwijken van de effectieve aantallen. Indien alle technieken ontwikkeld zijn, zal de aanvraag gesloten worden en zullen de overige dieren niet meer in experiment genomen worden. Hieronder staat een overzicht van de technieken die we willen ontwikkelen:

- **Multiplex analyse:** dit is een techniek waarmee maximaal 20 zelf te bepalen ontstekings-gemedieerde eiwitten gemeten kunnen worden in plasma. Tot dusver lieten we de meting uitvoeren op een andere afdeling, maar we willen deze techniek graag binnen onze eigen afdeling implementeren. Om deze meting optimaal voor te bereiden voor het meten van samples afkomstig uit een experiment en om de meting te standaardiseren, willen we hiervoor het bekomen muisplasma gebruiken.
- **Trombine generatie meting in muisplasma:** deze techniek wordt tot dusver gebruikt om een beeld te krijgen van de bloedstolling in humaan plasma. Door deze techniek ook op te zetten in muisplasma, kunnen we in samples van toekomstige experimenten een beeld krijgen van de bloedstolling door middel van het bepalen van de hoeveelheid gevormde trombine in plasma. Op deze techniek zullen een 4-tal variaties ontwikkeld worden om ook het effect van nieuwe anticoagulantia zoals Dabigatran etexilaat en Rivaroxaban te bepalen.
- **Muis APC assay:** deze techniek is afkomstig uit het laboratorium van Prof. Esmon in Oklahoma. We willen deze techniek gebruiken in ons lab om de hoeveelheden muis APC (een anti-stollingseiwit) te bepalen in samples van experimenten. Om de techniek op te zetten en de methode te standaardiseren is muisplasma nodig.
- **ELISA techniek voor het bepalen van FXIa, FIXa en FXa in muizenplasma:** door middel van deze techniek willen we de hoeveelheid geactiveerde stollingsfactoren XIa, IXa en Xa bepalen in muisplasma. Tot op heden werd activatie van stolling bij patienten bepaald door analyse van d-dimeren, trombine:antitrombine complexen en eventueel fragment 1+2. Er is echter behoefte aan nieuwe markers voor stollingsactiviteit, mede om de oorsprong van activatie (tissue factor : factor VII of factor XII route) te bepalen.

4 Dierproef

8. Experiment

- **Anesthesie:**
 - Isofluraan** : inleiden met 3 - 4 % (incubator) en onderhouden met 1.5 – 2.5 % (hoofdkapje).
- De vena cava wordt vrij geprepareerd (buik openen en organen naar één zijde verschuiven).
- Een 1 ml spuit met blauwe naald, gevuld met 3.2 mM citraat:
volume citraat: gewicht muis (gram) * 100 / 13 = x µl.
Voor een muis van 25 gram is dit ca. 190 µl 3.2 mM citraat.
- x µl citraat wordt i.v. via de vena cava toe gedient.
- Na 15 seconden wordt 1-1,2 ml bloed opgenomen in de spuit.
- Euthanasie: het middenrif wordt door geknipt en het hart en longen worden verzameld (n=30) of verwijderd.
- Citraat plasma:
 1. Volbloed wordt op 3000 rpm gecentrifugeerd voor 5 min.
 2. Plasma wordt overgehaald naar een nieuw buisje.
 3. Plasma wordt op 13000 rpm gecentrifugeerd voor 10 min (verwijderen cel en plaatjes restanten).
 4. Plasma wordt verzameld in een nieuw buisje en ingevroren met behulp van vloeibare stikstof.
 5. Plasma's worden bewaard bij -80 °C.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie/analgesie

- **Isofluraan** : inleiden met 3 - 4 % (incubator) en onderhouden met 1.5 – 2.5 % (hoofdkapje)
Tijdens de operatie wordt dmv pijnprikkels (met een pincet knippen tussen de teennagels, waarbij de poot wordt gestrekt; een reactie met trilling van de poot of het lichaam wordt beschouwd als pijnrespons) de effectiviteit beoordeeld. Indien positieve reactie wordt narcose bijgegeven : nasaal (isofluraan).
- **Analgesie:** voor het opofferen van de dieren zal er premedicatie toegediend worden door middel van midazolam/fentanyl.

9b. Pijnbestrijding

De dieren zullen voor het experiment premedicatie toegediend krijgen en zullen tijdens het experiment meteen opgeofferd worden. De dieren ontwaken niet meer uit de operatie dus post-operatieve pijnbestrijding is hier niet van toepassing.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Na afloop van de bloedafname wordt voor de zekerheid het middenrif doorgeknipt. Verder ontwaken de dieren niet meer na het uitvoeren van het experiment, dus euthanasie en humane eindpunten zijn hier niet van toepassing.

10a. Ongerief



Terminaal experiment onder narcose: 02

De dieren zullen onder narcose geëuthanaseerd worden en dit binnen enkele minuten na de aanvang van het experiment.

10b. Welzijnsevaluatie

Niet van toepassing

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen in groep gehuisvest worden met kooiverrijking en water en voer ad libidum.

12. Deskundigheid

Alle handelingen worden verricht door _____ (art.9) en _____ art.12). Beide hebben ruime ervaring met de aangegeven technieken.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

- **Anesthesie:**
 - Isofluraan** : inleiden met 3 - 4 % (incubator) en onderhouden met 1.5 - 2.5 % (hoofdkapje).
- De vena cava wordt vrij geprepareerd (buik openen en organen naar één zijde verschuiven).
- Een 1 ml spuit met blauwe naald, gevuld met 3.2 mM citraat:
volume citraat: gewicht muis (gram) * 100 / 13 = x µl.
Voor een muis van 25 gram is dit ca. 190 µl 3.2 mM citraat.
- x µl citraat wordt i.v. via de vena cava toe gedient.
- Na 15 seconden wordt 1-1,2 ml bloed opgenomen in de spuit.
- Euthanasie: het middenrif wordt door geknipt en het hart en longen worden verzameld (n=30) of verwijderd.
- Citraat plasma:
 1. Volbloed wordt op 3000 rpm gecentrifugeerd voor 5 min.
 2. Plasma wordt overgehaald naar een nieuw buisje.
 3. Plasma wordt op 13000 rpm gecentrifugeerd voor 10 min (verwijderen cel en plaatjes restanten).
 4. Plasma wordt verzameld in een nieuw buisje en ingevroren met behulp van vloeibare stikstof.
 5. Plasma's worden bewaard bij -80 °C.
- Organen: Hart en longen (n=30) worden uit genomen en opgeslagen bij -80 °C.

Relevante literatuur

1. Sommeijer DW, van Oerle R, Reitsma PH, Timmerman JJ, Meijers JC, Spronk HM, ten Cate H. Analysis of blood coagulation in mice: pre-analytical conditions and evaluation of a home-made assay for thrombin-antithrombin complexes. *Thromb J.* 2005;3:12.
2. Loubele ST, Spek CA, Leenders P, van Oerle R, Aberson HL, van der Voort D, Hamulyák K, Petersen LC, Spronk HM, ten Cate H. Active site inhibited factor VIIa attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Thromb Haemost.* 2009;7(2):290-8.
3. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.* 2003;9:338-342.
4. Manns BJ, Lee H, Doig CJ, Johnson D, Donaldson C. An economic evaluation of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2002;347:993-1000.

Formatted: Dutch
(Netherlands)



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, 28-09-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Verzamelen van muis plasma voor ontwikkeling en validatie analyse technieken*", is op de DEC vergadering van 23 september 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Punt 6- Door wie of welke commissie is **dit** DEC protocol wetenschappelijk beoordeeld en **akkoord** bevonden. De opmerking over de trombosestichting en de hartstichting kan verwijderd worden.
- Punt 7c- De DEC wenst een beschrijving en onderbouwing van de 12 technieken.
- Punt 9a- De DEC verzoekt de analgesie te borgen door het gebruik van midazolam/fentanyl of een opiaat.

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 **2011-125**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Voorzitter DEC-UMCPV,

Your reference

Our reference

Direct line

Maastricht
05.10.2011

DEC 2011-125

Internal Medicine

Geachte J leden van de DEC,

Met betrekking tot het commentaar op DEC-aanvraag 2011-125 : 'Verzamelen van muis plasma voor ontwikkeling en validatie analyse technieken' heeft de onderzoeker volgende antwoorden:

- De opmerking over de trombosestichting en hartstichting is verwijderd en de vraag door wie het project beoordeeld werd, is beantwoord.
- Een beschrijving en onderbouwing van de technieken is toegevoegd.
- De analgesie is aangepast.

T + 31 43 3
F + 31 43 3

Visiting address

Hopend hiermee naar tevredenheid antwoord te hebben gegeven,

Met vriendelijke groet,

Postal address
UNS50: Box 8
P.O. Box 616
6200 MD Maastricht
The Netherlands

Postal account 10 22 880
Bank account 85 79 82 990

VAT identification EU
NL003475268B01



Universiteit Maastricht

Aan:]

I

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
20-10-2011

Project: *Verzamelen van muis plasma voor ontwikkeling en validatie analyse technieken.*

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: 2011-125
Diersoort: muis
Aantal dieren: 250
Einddatum: 19-10-2015

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