

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM ⁸
Voorblad werkprotocol CPV ⁸

Versie nov. 2005

DECNR^{1#}: 2011-103

Ontvangen[#]: 21-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²
	Nieuw

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	
--------------	-------

Titel van het onderzoek:

Dose respons curve siRNA afgifte in de lever

startdatum **aug-2011**

einddatum ⁹ **aug-2015**

Duur van de proef¹⁰: 3 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. Verantwoorde-lijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art. 12	
5.				Art. 9	
6.					
7.					
8.					

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	exp	exp	ctrl	ctrl			
Diersoort	mouse	mouse	mouse	mouse			
Stam	Balb/c	Balb/c	Balb/c	Balb/c			
Construct / mutatie ?	-	-	-	-			
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02			
Aantal	98	98	7	7			
Geslacht	m/v	m/v	m/v	m/v			
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja			
Leeftijd/gewicht	6-10 wk	6-10 wk	6-10 wk	6-10 wk			
Doel van de proef *	33	33	33	33			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	01	01	01			
Anesthesie *	04	04	04	04			
Pijnbestrijding *	01	01	01	01			
Mate ongerief *	03	02	03	02			
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01			

* VHI-coderingen zie bijlage

Verantwoording

2

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. nov.'05)

Titel: Dose respons curve siRNA afgifte in de lever

1. Doel van de proef.

Microbellen worden klinisch gebruikt als contrastmiddel voor ultrageluid. De acoustische activatie van bellen kan ook gebruikt worden om de permeabiliteit van het endotheel te verhogen. Op deze manier kan lokaal de hoeveelheid van een medicijn in het weefsel worden verhoogd.

RNAi ("Ribonucleic acid interference") is een natuurlijk voorkomend mechanisme dat interfereert met de expressie van genen in levende cellen. Met name het siRNA ("small interfering Ribonucleic acid") is betrokken bij het RNAi mechanisme waar het specifiek de productie blokkeert (knockdown) van eiwitten die leiden tot een ziekte, zoals bijvoorbeeld metabolische aandoeningen. De siRNA technologie kan daarom gebruikt worden om ziekten te behandelen door het blokkeren van genexpressie die de ziekte veroorzaakt of in stand houdt.

In eerdere experimenten (DEC 2010-065) is aangetoond dat met behulp van ultrageluid de gegenereerde knockdown door siRNA afgifte in lever groter is dan wanneer geen ultrageluid therapie wordt toegepast. Aanvullend onderzoek is nodig om te bepalen hoeveel knockdown er wordt gegenereerd voor een range aan concentraties. De resultaten van dit onderzoek worden verzameld in een 'dose respons curve' en kunnen tevens gebruikt worden voor publicatie.

Doel van deze studie is het kwantificeren van het effect van ultrageluid en microbellen en siRNA op de concentratie mRNA in levercellen voor verschillende concentraties siRNA. Hierbij zal een vergelijking worden gemaakt voor verkregen knockdown met en zonder ultrageluid therapie, in combinatie met microbellen.

De evaluatie vindt plaats door gebruik te maken van een in DEC 2010-065 geverifieerde methode:

- 1) Leverweefsel te analyseren met qPCR, hierbij wordt gekeken naar de knockdown of expressie van het mRNA.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Metabole ziekten, zoals hoog cholesterol, obesitas en type 2 diabetes, vormen omvangrijke gezondheidsproblemen welke enkele honderden miljoenen mensen wereldwijd treffen. De Wereldgezondheidsorganisatie WHO schat het aantal mensen (wereldwijd) dat lijdt aan obesitas en type 2 diabetes op meer dan 300 miljoen en 159 miljoen respectievelijk.

RNA kan een belangrijke rol spelen als therapeutisch middel tegen metabole ziekten. Zo kunnen bijvoorbeeld genen die verantwoordelijk zijn voor een verhoogd cholesterol worden getarget.

3. Alternatieven

Voor het effectief behandelen van metabole ziekten met een afgifte systeem waarvan de werking berust op lokale afgifte na intraveneuze injectie is het essentieel te weten welk percentage van het therapeutisch middel zich ophoopt in de lever. Een dose respons curve geven over de gebruikte dosis in relatie tot de onstane knockdown van het getargete gen.

Aangezien met nieuwe materialen, dan wel nieuwe combinaties van materialen en ultrageluid gewerkt wordt, kan dit vanuit medische en ethische overwegingen niet direct in patiënten getest worden en komt alleen een diermodel in aanmerking.

Vooraf aan deze in vivo studie zijn de experimentele condities geoptimaliseerd en is een eerste bewijs van dit concept aangetoond (DEC 2010-065). Deze in vivo studie bouwt voort op de

4. Ethische afweging

De niet-invasieve ultrageluid geïnduceerde afgifte wordt in deze studie gebruikt om RNA af te geven in lever. Het patient-belang om onderzoek te doen naar de behandeling van metabole ziekten is groot. Wereldwijd zijn circa 3000 verschillende stofwisselingsziekten bekend en wordt geregeld ontdekt dat andere bekende ziekten veroorzaakt worden door een verstoorde stofwisseling. Relatief weinig metabole ziekten zijn te behandelen. Onbehandelbare stofwisselingsziekten leiden vaak tot overlijden.

Aangezien therapie met RNA nieuwe methoden/materialen zijn, is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Gezien het hoge aantal patienten dat gebaat is bij onderzoek naar effectievere behandelmethoden van metabole ziekten, weegt ons inziens de maatschappelijke relevantie op tegen het ongerief van het dier.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Microbellen worden klinisch gebruikt als ultrageluidcontrastmiddel voor het bepalen van de functie van de linker hartkamer en voor perfusie van het myocardium en bijvoorbeeld de lever, in het laatste geval met name voor oncologische toepassingen. Een microbel bestaat uit een gasbelletje, maximaal ter grootte van een rode bloedcel en heeft een schil van een polymeer, fosfolipide of een eiwit (albumine).

Het is bekend, dat microbellen het endotheel permeabel kunnen maken, waardoor medicijnen in grotere hoeveelheid het beoogde gebied kunnen bereiken. Kwantificatie van de extravasatie alsmede het ermee bereikte effect in termen van het blokkeren van de aanmaak van specifieke eiwitten zal afhangen van een groot aantal parameters zoals de gebruikte concentraties van microbellen en medicijn, en de ultrageluid instellingen.

In een voorafgaand experiment (DEC 2008-088) is de bloedkinetiek en biodistributie van de microbellen bestudeerd. De studie gaf aan dat de bellen lang genoeg circuleren om, in een muismodel, gedurende minimaal 5 minuten een behandeling met ultrageluid te kunnen uitvoeren op een vooraf bepaalde plaats in het lichaam. Bovendien is in DEC 2010-065, waar deze studie op voortbouwt, ook gebruikt gemaakt van deze microbellen. Tevens zijn in DEC 2010-065 in een pilot experiment alle parameters voor leverbehandeling met ultrageluid reeds geoptimaliseerd. Vervolgens is een effect waargenomen van de ultrageluid behandeling op de mate van gegenereerde knockdown. In die experimenten zijn twee verschillende concentraties siRNA gebruikt.

Om het effect van ultrageluid op de afgifte van siRNA te publiceren is het noodzakelijk een 'dose repons curve' te genereren. Deze curve geeft de gerealiseerde knockdown per siRNA concentratie weer. Het doel is een dose repons curve te verkrijgen voor 6 verschillende concentraties RNA. In voorgaande studie (DEC 2010-065) zijn echter al twee concentraties getest waardoor het aantal concentraties in deze studie beperkt kan worden tot $(6-2=) 4$.

Om het effect van ultrageluid aan te geven moet de gehele dose repons curve voor zowel behandeling met als zonder ultrageluid worden gegenereerd. Echter, om vast te stellen wat de exacte invloed is van het ultrageluid zelf, in combinatie met de microbellen, is het noodzakelijk om controles mee te nemen. In deze studie worden 2 soorten 'controle siRNAs' meegenomen. In DEC 2010-065 is al gebruikt gemaakt van 1 type controle siRNA; het 'scrambled siRNA'. Dit siRNA heeft dezelfde farmacokinetische eigenschappen als het therapeutisch siRNA, maar kan geen specifiek eiwit blokkeren. Hiermee zullen ook $(6-2=) 4$ concentraties getest worden. Echter, om meer zekerheid te krijgen over het bereikte effect en daarmee dus meer waarde op te hangen aan de verkregen resultaten bouwt deze studie de mogelijkheid in om ook een tweede controle siRNA op te nemen. Dit tweede type controle siRNA is ook een therapeutisch siRNA, maar codeert voor een ander eiwit. Hiermee zijn nog geen experimenten uitgevoerd, en zullen dus alle 6 de concentraties getest worden. In het geval dat de type 1 scrambled siRNA voldoende informatie geeft over het verkregen effect van ultrageluid behandeling op de afgifte van siRNA is de verwachting dat de experimenten met type 2 controle siRNA niet meer, of slechts voor 1 enkele concentratie, hoeven te worden uitgevoerd.

Om de achtergrond te meten van de expressie van het therapeuticum en om het effect van de microbellen al dan niet in combinatie met ultrageluid in kaart te brengen, is er een extra controlegroep nodig waarbij alleen fysiologisch zout wordt geïnjecteerd, al dan niet met microbellen en al dan niet met ultrageluid behandeling. In DEC 2010-065 is reeds een groep muizen behandeld met PBS zonder ultrageluid en microbellen. Deze groep hoeft dus niet meer opnieuw getest te worden en vervalt daarom in deze studie. Blijft over: PBS met microbellen met en zonder ultrageluid.

Het aantonen van knockdown is een eerste stap naar behandeling. Vervolgens zal ook gekeken

moeten worden wat het therapeutisch effect is dat wordt verkregen bij een bepaalde knockdown, ofwel, er moet getest worden op phenotype. In het geval van deze studie zou een verandering van LDL concentratie in het bloed waargenomen moeten worden. Voor het testen op phenotype kan worden volstaan met een het nemen van een bloedsample na euthanasie van het dier. Echter, voor een dier specifieke referentie wordt ook een bloedsample genomen voor de behandeling.

- Experiment 1: Dose respons curve

Opzetten van een dose respons curve. Hierbij dienen de geoptimaliseerde parameters en de behaalde resultaten van DEC 2010-065 als uitgangspunt. In deze studie wordt na afgifte van siRNA in levercellen het mRNA gekwantificeerd. Een dose respons curve zal gegenereerd worden voor de lever behandeling met en zonder ultrageluid, voor zowel het therapeutisch als controle RNA.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de Principal Investigator.

Dierproef

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam: muis Balb/c

herkomst: leverancier met geregistreerde fok/afleververgunning

eindbestemming: dood in de proef/dood na de proef

7b. Sexe

Er zijn geen verschillen te verwachten tussen beide geslachten, daarom kunnen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden.

7c. Aantallen: $196 + 14 = 210$ muizen

De belangrijkste analyse methode is qPCR van het effect van het therapeuticum. Power berekeningen (Students t-test onafhankelijke metingen) zijn uitgevoerd met het programma PS software van Vanderbilt University. We hebben gebruikt de Student's t-test met $\alpha = 0.05$ en Power = 0.8.

qPCR:

In voorgaande lever experimenten (DEC 2010-065) is de mRNA concentratie van het target gen in behandeld leverweefsel gemeten in PBS controle dieren, RNA behandelde dieren, en RNA + ultrageluid behandelde dieren. Indien de concentratie in PBS controle dieren gedefinieerd wordt als 1, is de concentratie in RNA behandelde dieren ongeveer 0.7, en RNA + ultrageluid behandelde dieren ongeveer 0.35, met standaard variaties van ongeveer 0.2. De behandelde en onbehandelde groepen zijn meestal even groot. Voor het software programma komt dit neer op een verschil van 0.35 met een SD van 0.2. De uitkomst is als volgt:

We are planning a study of a continuous response variable from independent control and experimental subjects with 1 control(s) per experimental subject. In a previous study the response within each subject group was normally distributed with standard deviation 0.2. If the true difference in the experimental and control means is 0.35, we will need to study 6 experimental subjects and 6 control subjects to be able to reject the null hypothesis that the population means of the experimental and control groups are equal with probability (power) 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05.

Dit betekent dat we een groepsgrootte van minstens 6 moeten gebruiken.

Experiment 1: Dose respons curve

In dit experiment zal, m.b.v. de gevonden optimale protocollen voor ultrageluid behandeling zoals gevonden in DEC 2010-065, het mRNA in levercellen, na siRNA, wordt gekwantificeerd om te komen tot een dose respons curve. Voor de kwantificatie wordt de meetmethode qPCR gebruikt, waarvoor zoals boven is aangegeven, een groepsgrootte van 6 nodig is.

In deze studie worden 4 verschillende doses van het therapeuticum bestudeerd en wordt een verschil gemaakt tussen behandeling met en zonder ultrageluid. In plaats van het therapeuticum worden ook twee typen controle RNAs gebruikt om de resultaten van het therapeuticum te kunnen rechtvaardigen. 4 Verschillende doses van het scrambled RNA type 1, en 6 verschillende doses van het controle RNA type 2. Ook worden er PBS controles meegenomen: met of zonder ultrageluid behandeling en beide met microbellen. Het aantal groepen komt dan op: $4 \times 2 \times 2 + 6 \times 2 \times 1$ (aantal doses * met/zonder ultrageluid * formuleringen) + 2 (PBS) = 30 groepen.

Voor elke groep zijn er 6 dieren ingepland.

Zie ook onderstaande tabel.

Aantal muizen	studiegroep	Formulering (incl microbubbles)	concentratie	ultrageluid
6	controle	PBS	-	Ja
6	controle	PBS	-	Nee
6	experiment	siRNA	1	Ja
6	experiment	siRNA	1	Nee
6	experiment	siRNA	2	Ja
6	experiment	siRNA	2	Nee
6	experiment	siRNA	3	Ja
6	experiment	siRNA	3	Nee
6	experiment	siRNA	4	Ja
6	experiment	siRNA	4	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	1	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	1	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	2	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	2	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	3	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	3	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	4	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	4	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	1	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	1	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	2	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	2	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	3	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	3	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	4	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	4	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	5	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	5	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	6	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	6	Nee

Experiment:

Uitval van 5%, groepsgrootte 6 dieren:

$$(a-0.05a) = 6, a = 6,31$$

totaal aantal benodigd: 7

$$\text{groepsgrootte} * \text{aantal groepen} = 7*(8*2+12*1) = 196 \text{ dieren}$$

Controle:

Uitval van 5%, groepsgrootte 6 dieren:

$$(a-0.05a) = 6, a = 6,31$$

totaal aantal benodigd: 7

$$\text{groepsgrootte} * \text{aantal groepen} = 7*2 = 14 \text{ dieren}$$

$$\text{Studie totaal} = 196+14 = 210 \text{ dieren}$$

8. Experiment

Voor de lever studie worden Balb/c muizen gebruikt.

Voor de start van behandeling zal een bloedsample genomen worden via de vena saphena, met een maximaal volume van 100 µl.

Voor de lever studie zal het dier onder anesthesie eerst van buikhaar worden ontdaan met het doel ultrageluid contact te bevorderen en hierbij het ongerief van het dier mbt opwarmen van de huid te verkleinen. Vervolgens zal therapie plaatsvinden.

De microbellen en het RNA worden geïnjecteerd via een catheter in de staartvene onder anesthesie. Per keer dat het dier onder anesthesie is, zal het totale injectie volume de 200 µL niet overstijgen.

Maximaal 72 uur na het experiment zullen de dieren onder anesthesie geëuthaniseerd worden. Na het experiment zullen bloed en weefsel samples worden genomen voor ex vivo onderzoek.

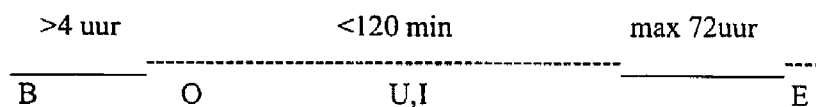
Experiment 1: Dose respons curve

Dit experiment bouwt voort op DEC 2010-065 Na siRNA afgifte zal het mRNA in levercellen worden gekwantificeerd om te komen tot een dose respons curve. Dit experiment bestudeert zowel de behandeling met als zonder ultrageluid voor zowel het therapeuticum als de controles voor zes verschillende concentraties. Zie onderstaande tabel.

Aantal muizen	studiegroep	Formulering (incl microbubbles	concentratie	ultrageluid
6	controle	PBS	-	Ja
6	controle	PBS	-	Nee
6	experiment	siRNA	1	Ja
6	experiment	siRNA	1	Nee
6	experiment	siRNA	2	Ja
6	experiment	siRNA	2	Nee
6	experiment	siRNA	3	Ja
6	experiment	siRNA	3	Nee
6	experiment	siRNA	4	Ja
6	experiment	siRNA	4	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	1	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	1	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	2	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	2	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	3	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	3	Nee
6	experiment	Scrambled RNA type 1	4	Ja
6	experiment	Scrambled RNA type 1	4	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	1	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	1	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	2	Ja

6	experiment	Controle RNA type 2	2	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	3	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	3	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	4	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	4	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	5	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	5	Nee
6	experiment	Controle RNA type 2	6	Ja
6	experiment	Controle RNA type 2	6	Nee

Behandelschema



B: Bloedsample via de vena saphena

O: plaatselijk ontharen van de muis

I: iv injectie formulering

U: iv injectie microbellen en ultrageluid behandeling

E: euthanasie, bloedsample

--- dier onder anesthesie

— dier niet onder anesthesie

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De dieren worden onder anesthesie gebracht door het toedienen van isofluraan (inductie 3-4%, onderhoud 1-2%) i.c.m. Medische Lucht 0,4 l/m als dragergas, in een inslaap-doos en vervolgens met een mondkapje.

9b. Pijnbestrijding

Onder normale condities zal geen pijnbestrijding worden toegepast. Indien de dieren echter tekenen van pijn vertonen (te herkennen aan afwijkend gedrag, zoals bv in elkaar gedoken zitten, inactiviteit, opstaande vacht, piepen bij aanraking, etc) zal in overleg pijnbestrijding (temgesic=buprenorfine; subcutane injectie 0.05 mg/kg, of rimadyl=carprofen; subcutane injectie 3 mg/kg) worden toegepast.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De dieren worden geeuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie onder algehele anesthesie of O₂/CO₂ kamer of met een overdosis pentobarbital of isofluraan. Euthanasie wordt uitgevoerd door een ervaren artikel 12 medewerker.

Wanneer de dieren tijdens of na het experiment tekenen vertonen van pijn en/of ongerief, zal direct contact worden opgenomen met de artikel 12 en/of 14 functionaris om het beleid te bepalen volgens de scoringslijst voor de welzijnsbewaking. Het welzijn van het dier staat voorop. In deze DEC zal gentherapie in de lever mbv ultrageluid en microbellen onderzocht worden. Er wordt geen

ernstige mate van ongerief verwacht. Deze verwachting is gebaseerd op resultaten en ervaringen van DEC 2010-065, waar reeds onderzocht is welke ultrageluid settings niet schadelijk zijn. Deze settings dienen als lijdraad voor deze aanvraag. Onder ernstig ongerief wordt verstaan: ernstige bloedingen/ kneuzingen en ernstige verslechtering van de algehele conditie van het dier, direct zichtbaar na behandeling of één dag na behandeling.

Zorg

10a. Ongerief



Het maximale ongerief voor het dier is weergegeven in onderstaande tabel:

Experiment 1: Dose respons curve

Controle groep PBS, met ultrageluid

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Bloed sample via vena saphena	1	2 min	02
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	1	10 min	02
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene	1	15 min	02
PBS: geen therapeutisch/ toxisch effect			
Ultrageluid behandeling onder anesthesie, gevolgd door bijkomen dier	1	max. 1,5 hours	03
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	02
Total			03

Controle groep PBS, zonder ultrageluid

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Bloed sample via vena saphena	1	2 min	02
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	1	10 min	02
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene	1	15 min	02
PBS: geen therapeutisch/ toxisch effect			
Geen Ultrageluid behandeling			
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	02
Total			02

Groepen met ultrageluid en therapeutikum

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Bloed sample via vena saphena	1	2 min	02
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	1	10 min	02
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene	1	15 min	02
Mogelijke therapeutisch/ toxisch effect van het therapeutikum *	1	max. 3 dagen	02
Ultrageluid behandeling onder anesthesie, gevolgd door bijkomen dier	1	max. 1,5 hours	03
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	02
Total			03

*zowel siRNA, scrambled siRNA en RNA type 2 kunnen therapeutisch en/of toxisch effect geven: ongerief code 02

Groepen zonder ultrageluid en therapeuticum

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Bloed sample via vena saphena	1	2 min	02
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	1	10 min	02
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene	1	15 min	02
Mogelijke therapeutisch/ toxisch effect van het therapeuticum *	1	max. 3 dagen	02
Geen Ultrageluid behandeling			
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	02
Total			02

*zowel siRNA, scrambled siRNA en RNA type 2 kunnen therapeutisch en/of toxisch effect geven: ongerief code 02

10b. Welzijnsevaluatie

.....(DEC 2010-065)..... De artikel 12 medewerker evalueert na elk experiment the conditie van en mate van ongerief bij het dier. Een artikel 12 medewerker zal dagelijks de gezondheid van de dieren controleren en documenteren.

11. Verzorging en huisvesting

..... De verzorging zal worden uitgevoerd door medewerkers van de Universiteit Maastricht en zal gebeuren volgens standaard richtlijnen. Bij eventuele calamiteiten zal de artikel 12/14 functionaris direct gewaarschuwd worden.

12. Deskundigheid

Ervaren artikel 12 functionarissen van de Universiteit Maastricht zullen het proefdierwerk uitvoeren.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

.....

Relevante literatuur

.....



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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Dose respons curve siRNA afgifte in de lever*", is op de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Bij punt 4 verzoekt de DEC het woord "voortijdig" te verwijderen.
- Punt 7c- De DEC verzoekt de uitval per groep te berekenen en daarna de aantallen aan te passen (consequenties voor de groepsgroottes).
- De DEC meent dat 8 concentraties voor een dosis-respons curve relatief veel is en vraagt zich af of dit wel nodig is. Er zijn al 2 concentraties bekend, dus men zou moeten weten welke effecten gevonden worden. De DEC zou ook graag de stappen van de concentraties willen weten.
- De DEC verzoekt het ongerief op het voorblad en punt 10a in overeenstemming te brengen.

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 2011-103, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

From:
Sent: donderdag 21 juli 2011 17:43
To:
Cc:
Subject: RE: Project 2011-103-w, respons
Attachments: 20110720_2011-103_liver dose respons_MQ-388-11.docx

Beste secretaris DEC

In antwoord op de vragen/opmerkingen van de DEC naar aanleiding van projectaanvraag 2011-103:

- Bij punt 4 verzoekt de DEC het woord “voortijdig” te verwijderen.
Dit is verwijderd.
- Punt 7c- De DEC verzoekt de uitval per groep te berekenen en daarna de aantallen aan te passen (consequenties voor de groeps groottes).
Dit is berekend en aangepast.
- De DEC meent dat 8 concentraties voor een dosis-respons curve relatief veel is en vraagt zich af of dit wel nodig is. Er zijn al 2 concentraties bekend, dus men zou moeten weten welke effecten gevonden worden. De DEC zou ook graag de stappen van de concentraties willen weten.
We zijn het met de DEC eens dat 8 concentraties relatief veel zijn, hoewel niet ongewoon bij in vivo siRNA studies. We verwachten dat in eerste instantie 6 concentraties voldoende zouden moeten zijn (de DEC aanvraag is naar aanleiding hiervan aangepast). Concentraties van 20 mg/kg en 50 mg/kg zijn reeds uitgevoerd (voor siRNA en scrambled siRNA, maar nog niet voor controle siRNA type 2). De planning is om vervolgens een hogere concentratie te gebruiken (100 mg/kg) en een lagere concentratie (5 mg/kg). Afhankelijk van het resultaat zullen vervolgens nog twee concentraties lager dan 5 mg/kg worden gekozen, of tussen de 5 en 20 mg/kg.
Wanneer blijkt dat meer dan 6 concentraties getest moeten worden, zal te zijner tijd een uitbreiding worden aangevraagd met bijbehorende argumentatie.
- De DEC verzoekt het ongerief op het voorblad en punt 10a in overeenstemming te brengen.
De kolommen op het voorblad zijn opgesplitst in vier kolommen, met de bijbehorende ongeriefcodes.

Bovenstaande aanpassingen zijn in aanvraag 2011-103 grijs gemarkeerd.
Hopende hiermee afdoende de vragen van de DEC te hebben beantwoord,

Met vriendelijke groet,

Sent: Tuesday 19 July 2011 10:26
To:

25-7-2011

Subject: Project 2011-013-w

Geachte onderzoeker,

Uw projectaanvraag is in de DEC-UM – vergadering van **15 juli 2011** besproken.

De uitslag treft u aan in bijgaand attachment.

Voortaan zult u uit efficiency overweging geen schriftelijke bevestiging meer ontvangen per post wanneer het een wijzigingsbrief betreft.

De DEC verzoekt U in een brief de vragen van de DEC te beantwoorden en de wijzigingen in het protocol duidelijk grijs te markeren, zodat het bij het kopiëren ook zichtbaar is.

Wanneer uw project is aangehouden (dit staat altijd in de brief) moet u er rekening mee houden dat de herziene terug moet naar de gehele commissie. Uw herziene versie dient uiterlijk 12 augustus 2011 binnen te zijn voor de vergadering van 26 augustus 2011 op het secretariaat.dec.

De eerstvolgende vergadering is 26 augustus 2011.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616- 6200 MD Maastricht
T (

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

The information contained in this message may be confidential and legally protected under applicable law. The message is intended solely for the addressee(s). If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any use, forwarding, dissemination, or reproduction of this message is strictly prohibited and may be unlawful. If you are not the intended recipient, please contact the sender by return e-mail and destroy all copies of the original message.

25-7-2011

Aan: _____

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
26-07-2011**Project:** *Dose response curve siRNA afgifte in de lever.*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

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-103
Diersoort: muis
Aantal dieren: 210
Einddatum: 26-07-2015

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