

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

versie jan. 2005

Herziene versie

DECNR: 2011-050

Ontvangen: 15-04-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
19-04-2011	Nieuw / Herziene / Pilot

VROM/GCONR ³
n.v.t.

LNV/CBDNR ⁴
n.v.t.

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

Deelproject	4. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

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

Budgetnummer	3098 2250B
--------------	------------

Titel van het onderzoek:

Vergelijking van het effect van UM206 en ACE-remming op de infarctheiling en de hartfunctie na een myocardinfarct

startdatum 01-05-2011

einddatum 30-04-2013

Duur van de proef¹⁰: 38 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	n.v.t.				
4. overige uitvoerenden	Art. 12 functionaris Farmacologie			Art.12 ⁸	
5. Principal Investigator				Art.9	

Diergroep	1	2	3				
ctrl/exp/sham	exp	exp	exp				
Diersoort	01	01	01				
Stam	Swiss	Swiss	Swiss				
Construct / mutatie ?	nvt	nvt	nvt				
Herkomst (leverancier) *	01	01	01				
Aantal	12	23	23				
Geslacht	♂	♂	♂				
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	10w	10w	10w				
Doel van de proef *	31	31	31				
Belang van de proef *	01	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01				
Bijzondere technieken *	01	01	01				
Anesthesie *	04	04	04				
Pijnbestrijding *	04	04	04				
Mate ongerief *	05	05	05				
Toestand dier einde exp*	01	01	01				

* VHI-coderingen zie bijlage

Titel: Vergelijking van het effect van UM206 en ACE-remming op de infarctheling en de hartfunctie na een myocardinfarct

1. Doel van de proef.

Het myocardinfarct is een veel voorkomende cardiovasculaire aandoening met een hoge ziektebelasting en sterfte. Door een sterke verbetering van de behandeling van de acute fase van het myocardinfarct, overlijden minder mensen kort na het infarct waardoor ze in de fase van wondheling terecht komen. Als de wondheling niet goed verloopt, ontstaat er een uitrekking van het infarctweefsel, waardoor de gehele hartspier gaat verwijden. Dit is een belangrijke risicofactor voor het ontstaan van hartfalen. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat een bepaald celtype in het infarct gebied, de myofibroblast, de dilatatie van het infarctgebied kan helpen voorkomen. In eerdere experimenten werden muizen voor korte termijn (10dagen; DEC 2008-122) en lange termijn behandeld (5weken; DEC2009-005) behandeld. Na 10 dagen zagen we duidelijk minder dilatatie in de UM206 behandelde groep. De 5 weekse behandeling bleek de functie van het hart te verbeteren en het ontstaan van hartfalen volledig te voorkomen.

Het doel van het huidige experiment is om te bestuderen hoe de effecten van UM206 zich verhouden tot die van een standaard-therapie bij hartfalen, namelijk een ACE remmer. Hiertoe worden UM206-behandelde muizen vergeleken met captopril-behandelde muizen; bovendien wordt een derde groep muizen behandeld met beide middelen om een mogelijk additioneel effect van de gecombineerde therapie te onderzoeken.

Dit onderzoek past goed binnen

onderzoekslijn II en maakt deel uit

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Dit onderzoek heeft een groot maatschappelijk belang. Jaarlijks sterven vele mensen aan hartfalen ten gevolge van een myocardinfarct. Door goed wetenschappelijk onderzoek komen we steeds meer te weten en kunnen we de diagnose en therapie steeds verder optimaliseren. Dit onderzoek is gericht op het verder karakteriseren van de effecten van UM206 op de kwaliteit van de infarctheling, zodat hartfalen kan worden voorkomen.

3. Alternatieven

De wondgenezing die optreedt na het hartinfarct is een proces waarbij vele celtypes in een driedimensionale structuur samenwerken. Daarom is het onmogelijk om een dergelijk proces te bestuderen mbv celculturen, die veelal tweedimensionaal zijn en uit één celtype bestaan. Tevens is het niet mogelijk om de ritmische belasting en het effect van de bloeddruk *in vitro* na te bootsen. Het onderzoek kan ook niet in de mens worden uitgevoerd. Induceren van hartinfarct van gecontroleerde omvang is in mensen niet realistisch. Proefdiermodellen geven een goede afspiegeling van infarct heling bij de mens en bieden de mogelijkheid om de effecten van farmacologische interventie op de verschillende fasen van het helingsproces te bestuderen.

4. Ethische afweging

Het belang van het optimaliseren van de therapie van het myocardinfarct en het voorkomen van hartfalen weegt naar de mening van de onderzoekers op tegen het ernstig ongerief dat de proefdieren in deze studie zullen ondervinden.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Het hartinfarct is een van de meest voorkomende cardiovasculaire gebeurtenissen in de westerse wereld en gaat gepaard met een hoge mortaliteit en morbiditeit. Jaarlijks sterven vele mensen aan deze aandoening of raken (gedeeltelijk) arbeidsongeschikt. Na een hartinfarct treedt een complex genezingsproces op dat begint met de dood van cardiomyocyten, waarna een ontstekingsreactie op gang komt om de dode cardiomyocyten op te ruimen. Hierna volgt de daadwerkelijke wondgenezing die begint met de vorming van granulatieweefsel om zo uiteindelijk een stevig litteken te vormen. In dit granulatieweefsel vormen de myofibroblasten een van de belangrijkste celtypen, omdat zij de wondcontractie verzorgen en gelijktijdig in staat zijn om extracellulaire matrix te synthetiseren. Zowel tijdens het genezingsproces als daarna kan er een heleboel misgaan. Tijdens de genezing kan het infarctgebied gaan scheuren, een complicatie die bekend staat als infarctruptuur. Maar ook nadat het litteken is gevormd kunnen complicaties optreden. Het hart probeert zich aan te passen aan de veranderde werkbelasting, maar omdat hartspiercellen niet meer kunnen delen, zijn de aanpassingsmogelijkheden beperkt tot hypertrofie en dilatatie. Uit de kliniek is bekend dat het hart op een bepaald moment niet meer kan compenseren waardoor hartfalen kan ontstaan. In het verleden hebben we ontdekt dat onderdelen van de Wnt/frizzled pathway, voornamelijk de frizzled-2 receptor, tot expressie komen op myofibroblasten tijdens de infarctheling. Deze onderzoeken zijn destijds uitgevoerd op RNA niveau. Tot nu toe waren er geen goede specifieke blokkers van de frizzled-2 receptor. In ons lab hebben we recent de antagonistisch stof UM206 ontwikkeld. Deze is reeds uitvoerig op verschillende cellijnen getest. De eerste studie werd reeds afgerond en hier werden een sterke toename van het aantal myofibroblasten en verminderde dilatatie van het hart vastgesteld (DEC2008-122). De langere behandeling van 35 dagen gaf nog een verdere verbetering van de hartfunctie en zelfs zo dat de overleving significant is verbeterd tov de niet behandelde dieren (DEC2009-005). Uit beide studies blijkt dus dat UM206 de hartfunctie opmerkelijk verbetert. De vraag komt nu echter op hoe de effecten van UM206 zich verhouden tot die van de standaardtherapie voor myocardiinfarct-patiënten met een ACE-inhibitor. Daarom wordt in dit project het effect van UM206 vergeleken met de ACE-inhibitor captopril en worden beide middelen ook samen toegediend om een eventueel additioneel effect te onderzoeken.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is gelezen en goedgekeurd door

, hoofd

UM.

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Bij deze experimenten zal gebruik worden gemaakt van swiss muizen (10w), geleverd door Charles River. De dieren worden gedood aan het einde van de proef.

7b. Sexe

In meerdere publicaties (Cavasin et al., Life Sci 75:2181-2192,2004) zijn effecten van het geslacht op infarctheiling beschreven. Uit deze studie blijkt dat infarctheiling bij mannelijke muizen sneller verloopt dan bij vrouwen, met sterkere ontstekingsreactie en meer remodelering van het infarctgebied in de eerste dagen na een hartinfarct. Omdat het uiteindelijke doel is om te kijken of UM206 in muizen na hartinfarct leidt tot verbeterde hartfunctie, is het beter mannetjes te gebruiken, daar het effect van UM206 in dit geslacht meer uitgesproken zal zijn.

7c. Aantallen

Powerberekening kan met de formule van L.Sachs: $n=2(z_{\alpha/2}-z_{\pi})^2 \cdot (\sigma/\delta)^2$

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 $n=15.7 \cdot (\sigma/\delta)^2$

Op grond van eerdere experimenten wordt de spreiding (σ) van het linker ventrikel eind diastolisch ~~volume~~ en ~~massa~~ geschat op 50%. We willen een verschil (δ) van 50% tussen de groepen aantonen. Dus $n=15.7 \cdot (0.5/0.5)^2=15.7$

De te verwachten uitval door MI operatie is 30% (dit uitvalspercentage is geschat aan de hand van jarenlange ervaring van de medewerkers van het dierenlaboratorium van ~~het~~ Het betreft perioperatieve sterfte, dwz. sterfte door een te groot infarct, een ritmestoornis tijdens de ingreep of het niet meer op gang komen van de zelfstandige ademhaling na de ingreep. De uitval kan zo klein mogelijk worden gemaakt door zorgvuldig de juiste hoogte te kiezen waarop de kransslagader wordt afgebonden, waarbij de ervaring van de art. 12 functionaris essentieel is. Indien de ademhaling niet spontaan op gang komt wordt de beademing enige tijd voortgezet waarna nogmaals wordt geprobeerd het dier spontaan te laten ademen).

Groepsgrootte captopril 15.7 en uitval 30%: $(a-0.3a)=15.7$ $a=22.4$, dus 23 dieren

Groepsgrootte captopril + UM206 15.7 en uitval 30%: $(a-0.3a)=15.7$ $a=22.4$, dus 23 dieren

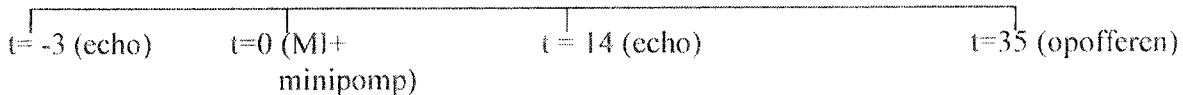
Groepsgrootte UM206: hier kan worden teruggevallen op de resultaten van een eerdere studie (DEC2009-005). Om zeker te stellen dat de uitkomsten van het huidige project vergelijkbaar zijn met deze studie wordt in deze groep de helft van het aantal dieren ($23:2=11.5$ dus 12 dieren) ingezet.

4 Dierproef

8. Experiment

Op dag -3 worden er een echografie genomen bij de dieren. Op dag 0 krijgen alle dieren een infarct door afbinden van een coronair-arterie. Groep 1 krijgt een minipompje geïmplantéerd met UM206 (6 microgram/kg.dag), groep 2 met captopril (30 mg/kg.dag) en groep 3 met de combinatie. De stoffen worden subcutaan toegediend met een osmotische minipomp (Alzet model 2006 met 0.15µl/uur gedurende 42 dagen). Na twee weken wordt bij alle dieren een echo gemaakt om de progressie van de dilatatie van het infarct in te schatten. Na vijf weken worden alle dieren opgeofferd. De dieren worden dan eerst geechografeerd om de MI grootte te bepalen. Vervolgens wordt er een dp/dt meting uitgevoerd. De dieren zullen door middel van een terminale verbloeding onder narcose worden opgeofferd. De organen worden ook deels gecollecteerd voor RNA, eiwit en immunohistochemie.

Schema :



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Bij echografie worden de muizen ingeleid met isofluraan 3-4%, de anesthesie wordt onderhouden met 1.5-2.5% isofluraan. Bij myocard infarct worden de dieren ingeleid met isofluraan 3-4%, daarna wordt een tracheacanule ingebracht en wordt de anesthesie verder onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%. Bij de echografie op dag 35 worden de muizen ingeleid met isofluraan 3-4%, de anesthesie wordt onderhouden met 1.5-2.5% isofluraan. Vervolgens worden de dp/dt metingen uitgevoerd onder verdoving. Hierna worden de dieren geëuthaniseerd door cervicale dislocatie.

9b. Pijnbestrijding

Voor de operatie wordt de pijnstiller buprenorfine (Temgesic) 0.1mg/kg s.c toegediend. Na de operatie worden de dieren in een verkoeverkamer warm gehouden. Op het einde van de dag wordt de pijnstiller buprenorfine (Temgesic) 0.1mg/kg s.c toegediend. De volgende dag wordt de subcutane injectie van buprenorphine herhaald.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Indien het moreel en/of ethisch niet meer aanvaardbaar is om een dier in leven te laten, blijkend uit cachexie, de afwezigheid van exploratief gedrag en/of het niet meer eten en drinken, zal voortijdig euthanasie plaatsvinden door cervicale dislocatie. Meetbare gegevens zijn een extreem gewichtsverlies (>20%), wat leidt tot opoffering van de dieren. Ook cyanose en geforceerde ademhaling vormen aanleiding tot opoffering van een dier. Farmaca worden aseptisch toegediend via een osmotische minipomp om infecties zoveel mogelijk te voorkomen. Een mogelijke complicatie van de minipomp implantatie is het open gaan van de incisie waardoor de pomp is ingebracht, dit komt overigens maar zelden voor. Indien dit niet meer gehecht kan worden wordt



het dier opgeofferd. Ook het optreden van andere complicaties, zoals b.v. een hersenbloeding, vormt aanleiding tot het opofferen van het dier.

10a. Ongerief

Alle experimentele groepen:

ongerief c.q. pijn bij voorbereiding:

niet van toepassing

ongerief c.q. pijn tijdens de ingreep:

geen ivm algemene anesthesie

interventie	duur	frequentie	ongerief
echocardiografie	10 min	3x	02
Induceren MI	30 min	1x	05
Minipomp plaatsen	5 min	1x	02
Hemodynamica meting	45 min	1x	02
Leven met infarct	5 weken	1x	03

Het totale ongerief moet worden gekwalificeerd als ernstig (categorie 05). **Indien dieren**

zijn in dit experiment genoemd

10b. Welzijnsevaluatie

De verantwoordelijke onderzoeker is verantwoordelijk voor het welzijn van de dieren tijdens het experiment. Na de eerste dag, waarin pijnbestrijding wordt gegeven, wordt het myocardinfarct door de meeste dieren goed verdragen. De dieren zijn actief, eten en drinken goed (weinig gewichtsverlies) en hebben een goed verzorgde vacht. Dieren die hartfalen ontwikkelen zijn te herkennen aan passiviteit, een slecht verzorgde vacht en zullen voortijdig worden geëuthaniseerd door cervicale dislokatie. Gewichtsverlies (>20%) en ontstaan van longoedeem, cyanose zullen nauwkeurig worden opgevolgd omdat dit aanwijzingen zijn voor het ontstaan van hartfalen.

11. Verzorging en huisvesting

Verzorging en huisvesting vinden plaats volgens de normen van de centrale Proefdiervoorziening van de UM. De dieren zullen sociaal worden gehuisvest.

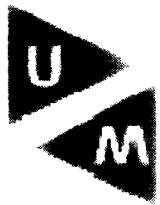
12. Deskundigheid

De experimenten worden uitgevoerd onder de verantwoordelijkheid van een verantwoordelijke onderzoeker en een vervangend verantwoordelijke onderzoeker. Beide onderzoekers zijn Art.9 bevoegd. De experimenten worden uitgevoerd door de art.12 functionarissen van het

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Er wordt verwezen naar de volgende SOPs (in bezit van de DEC)

- Echografie bij de muis (SOP FAR-02-M)
- Minipomp (SOP FAR-03-M)
- Myocardinfarct bij de muis (SOP FAR-05-M)



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, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Vergelijking van het effect van UM206 en ACE-remming op de infarcthealing en de hartfunctie na een myocardinfarct*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De titel op het voorblad ontbreekt. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De DEC verzoekt de PI van het voorblad te verwijderen (VO kan geen PI voor dit DEC protocol zijn).
- Bij punt 4 verzoekt de DEC het woordje "ernstig" toe te voegen bij het ongerief.
- Bij punt 7c vraagt de DEC zich af op welke parameters de sigma en delta betrekking hebben.
- Bij punt 10a merkt de DEC op dat het ontwikkelen van hartfalen niet hoeft te lijden tot zeer ernstig ongerief als de dieren tijdig uit experiment worden gehaald en verzoekt dit uit de tabel te verwijderen. Indien dieren hartfalen ontwikkelen dient zo spoedig mogelijk het humane eindpunt te worden toegepast.

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 2011-050, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan de Dierexperimenten Commissie
Universiteit Maastricht

betreft: aanvraag 2011-052

Geachte leden van de DEC,

Maastricht, 15-4-2011

Naar aanleiding van uw brief d.d. 29-03-2011 met kenmerk MQ-171-11 bericht ik u als volgt:

- De titel op het voorblad ontbreekt. De DEC verzoekt dit aan te passen.
De titel is toegevoegd aan het werkblad
- De DEC verzoekt de PI van het voorblad te verwijderen (VO kan geen PI voor dit DEC protocol zijn).
Dit is aangepast op het voorblad. Als PI is opgenomen.
- Bij punt 4 verzoekt de DEC het woordje “ernstig” toe te voegen bij het ongerief.
Dit is toegevoegd aan punt 4 van de aanvraag.
- Bij punt 7c vraagt de DEC zich af op welke parameters de sigma en delta betrekking hebben.
Het gaat hier om de parameters eind diastolisch volume en $+dP/dt$ (de drukopbouw in het linker ventrikel in de tijd). Dit is aangegeven in de tekst bij punt 7c.
- Bij punt 10a merkt de DEC op dat het ontwikkelen van hartfalen niet hoeft te lijden tot zeer ernstig ongerief als de dieren tijdig uit experiment worden gehaald en verzoekt dit uit de tabel te verwijderen. Indien dieren hartfalen ontwikkelen dient zo spoedig mogelijk het humane eindpunt te worden toegepast.
Op dit punt ben ik het volledig eens met de DEC. We zullen de dieren zeer regelmatig controleren om hartfalen zo vroeg mogelijk vast te stellen en vervolgens het humane eindpunt toe te passen. De regel is uit de tabel verwijderd en de tekst bij punt 10a is aangepast.

Ik hoop dat de door door u aangegeven punten voldoende zijn beantwoord. Indien er nog andere aspecten moeten worden aangepast dan hoor ik dat graag van u.

Hoogachtend,



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht

043-

21-04-2011

Project: Vergelijking van het effect van UM206 en ACE-remming op de infarcthelings en de hartfunctie na een myocardinfarct.

DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

T 043

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

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

Postadres

Postbus 616

6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-050

Diersoort: muis

Aantal dieren: 58

Einddatum: 19-04-2015

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