

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-065

Ontvangen: 19-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
28-05-2011	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	3098.2299 B
--------------	-------------

Titel van het onderzoek:

Vernakalant, de effecten op atriale en ventriculaire elektrofysiologie en hemodynamica en het mechanisme van terminatie van atrium fibrilleren in het model van de geit.

startdatum Mei 2011

einddatum ⁹ April 2015Duur van de proef¹⁰: 6 maanden

	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. overige uitvoerenden				Art.12	
4. overige uitvoerenden				Art.9	
5. PI				Art.9	

Diergroep	1	2	3	.	.	.	.
Protocol	1	2 & 3	4				
Diersoort	43	43	43				
Stam	-	-	-				
Construct / mutatie ?	-	-	-				
Herkomst (leverancier) *	03	03	03				
Aantal	5	25	57				
Geslacht	V	V	V				
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja				
Leeftijd/gewicht	40-60 kg	40-60 kg	40-60 kg				
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 *	03	05	03				
Toestand dier einde exp*	01	01	01				

* VHI-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Vernakalant, de effecten op atriale en ventriculaire elektrofysiologie en hemodynamica en het mechanisme van terminatie van atrium fibrilleren in het model van de geit.

1. Doel van de proef.

Atrium fibrilleren (AF) is een snel en onregelmatig ritme van de atria. De belangrijkste symptomen zijn hartkloppingen, duizeligheid en verminderd uithoudingsvermogen. Atrium fibrilleren kan getermineerd worden door de behandeling met antiaritmische medicijnen. Deze medicijnen grijpen in op de elektrofysiologische eigenschappen van het gehele hart. Aangezien de compositie van de actiepotentiaal voor ventriculaire en atriale myocyten verschilt, kan bij farmacologische behandeling van AF ook ongewenste ventriculaire ritme stoornissen worden opgewekt.

Recentelijk is een nieuw antiaritmisch medicijn, Vernakalant, op de Europese markt beschikbaar gekomen welke atrium specifieke effecten heeft. Het onderhavige onderzoek is er op gericht een beter inzicht te verkrijgen in het mechanisme van terminatie van AF onder invloed van Vernakalant. De volgende vragen zullen beantwoord worden:

- Wat is het effect van Vernakalant in de geit op de elektrofysiologische eigenschappen van de atria en ventrikels voor en na elektrische remodelering?
- Wat is het werkingsmechanisme van Vernakalant in verschillende stadia van remodelering in de geit?
- Welk positief inotroop effect heeft Vernakalant in de atria van de geit, voor en na elektrische remodelering?

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Atrium fibrilleren is de meest voorkomende chronische ritmestoornis die 6% van de populatie boven de 60 jaar treft. Deze prevalentie neemt toe tot 18 % bij mensen boven de 85 jaar. In de toekomst zal het aantal mensen met atrium fibrilleren nog aanzienlijk toenemen door de vergrijzing van de bevolking. Deze epidemie zal aanzienlijke socio-economische gevolgen met zich meebrengen.

Voor een optimale behandeling van AF patiënten met een atrium specifiek medicijn is een beter inzicht in de werking van Vernakalant noodzakelijk. In deze studie wordt ingegaan op de werking van Vernakalant in de verschillende stadia van AF. Op basis van de huidige kennis kan ook een contractiliteit verhogend effect verwacht worden. Een toename in atriale contractiliteit, in de dagen na een AF episode, zou een trombo-embolisch accident, de belangrijkste complicatie van AF, kunnen voorkomen. Deze studie zal een bijdragen leveren om tot met een optimale behandeling van AF met Vernakalant te komen.

3. Alternatieven

De ontwikkeling van AF is een complex en progressief proces. Hierbij spelen verschillende factoren een rol, namelijk elektrofysiologische eigenschappen van de myocyten, hemodynamica en anatomie kunnen worden genoemd. De vraagstellingen dienen te worden getoetst in een fysiologisch model, dit kan niet gesimuleerd worden in een computer of een cellulair model.

4. Ethische afweging

In Nederland lijdt een grote groep van de bevolking, 240.000 mensen, aan AF. De belangrijkste symptomen zijn hartkloppingen, duizeligheid en verminderd uithoudingsvermogen, welke resulteren in een daling van de levenskwaliteit. Nog belangrijker zijn de complicaties ten gevolge

van trombo-embolische accidenten, zoals een cerebrovasculaire beroerte, die niet enkel de levensverwachting van patiënten verminderen maar vaak ook uitmonden in een blijvende fysieke handicap, zoals verlamming, afasie of dementie. Het onderhavige onderzoek is er op gericht een beter inzicht te verkrijgen in het mechanisme van terminatie van AF onder invloed van Vernakalant. Dit kan mogelijk leiden tot een betere behandeling van AF patiënten.

Wij zijn van mening dat ondanks het matig en ernstig ongerief in deze aanvraag het verbeteren van de behandeling van AF een ethische verantwoording geeft om dit project uit te voeren.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Tijdens het sinus ritme is een rustig en regelmatig ritme in de atria aanwezig. Een depolariserende golf start vanuit de sinusknoop, geleid homogeen over de atria tot beide geheel zijn geactiveerd en zal vervolgens uitdoven. Gedurende AF worden de atria continu geactiveerd. Meerdere golven geleiden chaotisch over het oppervlak zonder uit te doven. Gedurende de eerste week van AF vindt elektrofysiologische en mechanische remodelering plaats. Deze remodelering stabiliseert het fibrillatie proces op zich en resulteert in een verkorting van de actiepotentiaal en een vermindering van atriale contractiliteit. Op langere termijn vindt ook structurele remodelering plaats welke zich met name uit in een toename van fibrose [1].

In een vroeg stadium kan AF getermineerd worden met behulp van een elektrische shock of doormiddel van antiaritmica. Voor de farmacologische behandeling van AF kan gekozen worden voor klasse I en III antiaritmica. Klasse I antiaritmicum grijpt in op de natrium kanalen. Een blokkade van de natrium kanalen verlaagt de geleidingssnelheid, met name op draaipunten van de fibrillatie golven. Deze eigenschap verkleint het aantal mogelijk aanwezige golven. Een minder aantal stabiele fibrillatie golven zal leiden tot cardioversie, het terugkeren in het sinus ritme. Klasse III antiaritmica verlengt de actiepotentiaal door repolariserende kalium stromen te inhiberen. Een vertraging van de repolarisatie verlengt de refractaire periode. Door een verlenging van de refractaire periode wordt de minimale golflengte van de fibrillatie golven verlengd. Dit heeft tot gevolg dat ook onder invloed van klasse III medicijnen minder golven in de atria aanwezig zijn en kan daardoor cardioversie bewerkstelligen.

Vernakalant is een anti-aritmicum dat zowel klasse I als Klasse III eigenschappen heeft [2]. Dit maakt Vernakalant op zich niet uniek. Een veel gebruikt middel in de kliniek, Amiodorone, bezit ook beide eigenschappen. Echter, de effectiviteit is beperkt. Uit een recent verschenen *multi centre trial* blijkt bij Amiodorone 5,2% van de patiënten met *recent onset AF* te cardioverteren, ten opzichte van 51,7 % voor Vernakalant [3]. De werking van Vernakalant grijpt dus in op natrium en kalium kanalen. Naast blokkade van het I_{kr} kanaal, komt zowel tot expressie op atriale als ventriculaire myocyten, worden ook atrium specifieke kanalen als I_{kur} en I_{KACH} geblokkeerd. Uit klinische trials blijkt dan ook gering effect op de ventriculaire elektrofysiologie. Een verbreding van het QRS complex en een verlenging van slechts 10 ms QTc tijd (~10%) wordt gerapporteerd [4].

De contractiliteit in atriale myocyten is afhankelijk van de hoeveelheid vrij gekomen calcium, vanuit het SR, gedurende de repolarisatie periode. Indien de actiepotentiaal wordt verlengd zal meer calcium vanuit het SR vrijkomen. Op grond hiervan is de verwachting dat Vernakalant een positief inotroop effect heeft. Dit is een zeer belangrijke eigenschap in het tegen gaan van trombo-embolische events na cardioversie.

Hypotheses:

- Vernakalant heeft in de geit een atrium specifieke effect op elektrofysiologische parameters tijdens verschillende stadia van AF.
- De gecombineerde blokkade van natrium en kalium kanalen heeft een synergistische werking en leidt tot terminatie van AF.
- Vernakalant kan de contractiliteit herstellen/vergroten in geiten met en zonder contractiele remodelering.

Deze studie zal in samenwerking met de MSD, de patenthouder van dit medicijn, worden uitgevoerd.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit Dec protocol is gelezen en akkoord bevonden door de PI (vermeld op het voorblad).

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

Eerdere studies binnen onze groep (DEC, 2002-93, 2003-103 en 2004-148) hebben aangetoond dat de Hollandse witte melk geit een uiterst geschikt model is voor ons doel. De geit heeft goed gedefinieerde atriale elektrofysiologische eigenschappen die lijken op de menselijke atria. De geiten worden gekocht bij lokale Nederlandse boeren door het CPV. De dieren worden gedood aan het einde van de proef.

7b. Sexe

Zoals in eerdere experimenten willen we vrouwelijke geiten blijven gebruiken omdat de omgang en huisvesting van mannelijke geiten problemen m.b.t. stankoverlast en hantering met zich mee brengt. Tevens zijn alle historische gegevens gebaseerd op vrouwelijke dieren.

7.c. Aantallen**Protocol 1**

Er zijn geen historische data aanwezig voor de bepaling van de farmacokinetiek in de geit. De n geeft aan dat een aantal van vijf dieren afdoende is om de farmacokinetiek te berekenen. Dit aantal is gebaseerd op eerdere bevindingen in honden en varkens.

Totaal: 1 groep van 5 dieren = 5

Protocol 2

Aantallen zijn berekend op basis van de formule van Sachs. De te meten parameters in dit protocol zijn o.a. geleidingssnelheid, refractaire periode, AF induceerbaarheid en AF stabiliteit. Naar verwachting zal de geleidingssnelheid de grootste spreiding geven, ~20%. Het beoogde effect is 25%.

Bij een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7 \rightarrow 15,7 * (20/25)^2 = 10,05$. Het te verwachten uitval is met name ten gevolge van slecht functionerende elektroden maar ook tgv infecties. Het uitval wordt geschat op 15%. $10,05/0,85 = 11,82 \rightarrow 12$ dieren.

Totaal: 1 groep van 12 dieren = 12

Protocol 3

Aantallen zijn berekend op basis van de formule van Sachs. De te meten parameters in dit protocol zijn o.a. atriale contractie patroon, druk in de rechter atrium, arbeid en refractaire periode. Naar verwachting zal atriale arbeid de grootste spreiding geven, ~20%. Het beoogde effect is 25%.

Bij een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7 \rightarrow 15,7 * (20/25)^2 = 10,05$. Het te verwachten uitval is met name ten gevolge van slecht functionerende elektroden en dislocatie van de druk katheter, maar ook tgv infecties. Het uitval wordt geschat op 20%. $10,05/0,80 = 12,56 \rightarrow 13$ dieren.

Totaal: 1 groep van 13 dieren = 13

Protocol 4

Aantallen zijn berekend op basis van de formule van Sachs. De te meten parameters in dit protocol zijn o.a. aantal golven, golf breedte en dissynchronie. Naar verwachting zal de dissynchronie de grootste spreiding geven, ~25%. Het beoogde effect is 25%.

Bij een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7 \rightarrow 15,7 * (25/25)^2 = 15,70$. Het te verwachten uitval ten gevolge van dislocatie en slecht functionerende elektroden, experimenten onder anesthesie en infecties is 15%. $15,70/0,85 = 18,47 \rightarrow 19$ dieren.

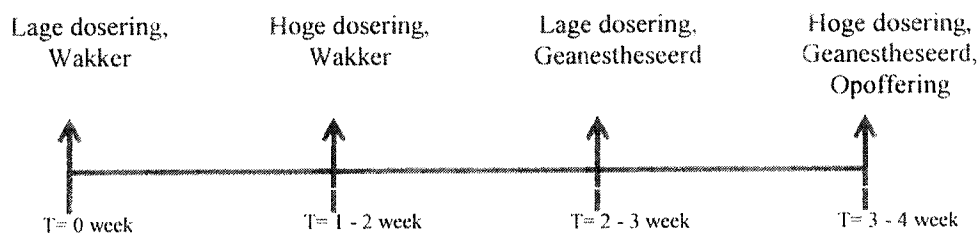
Totaal: 3 groepen van 19 dieren = 57

Totaal aantal dieren. $5 + 12 + 13 + 57 = 87$

8. Experiment

Protocol 1, **Farmacokinetiek.**

Alvorens de studie wordt gestart dient de farmacokinetiek in de geit bepaald worden. Een bolus Vernakalant zal worden toegediend gevolgd door een intra veneus onderhoudsinfuus gedurende 30 minuten. Op gezette tijden zullen, voor een periode van 8 uur, via een ander infuus bloedmonsters worden afgenomen. Gedurende de eerste uren zal continu het ECG gemonitord worden. Per geit worden twee concentraties getest. Een lage en een hoge dosering. Uit eerdere studies, in varkens en honden, blijkt dat tijdens anesthesie een ander concentratie vereist is. Daarom zal het experiment onder anesthesie met andere doseringen herhaald worden. Naast een standaard ECG zal dan ook de hemodynamiek gemonitord worden. Na afloop van het hoge doseringsexperiment wordt de geit geëuthanaseerd. Weefsels kunnen eventueel gebruikt worden voor overige in vivo studies.



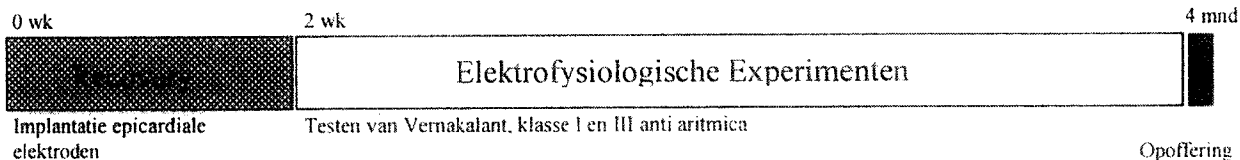
Protocol 2,

Het effect van Vernakalant op atriale en ventriculaire elektrofysiologische eigenschappen met en zonder elektrische remodellering.

De actiepotentialaal wordt beïnvloed door anesthetica. Daarom wordt voor dit protocol gekozen voor het AF model in de wakkere geit. Middels een open thorax operatie worden elektroden op het rechter en linker atrium geïmplant en tevens op de ventrikels. De aansluitkabels voor deze elektroden worden via de nek naar buiten getunneld. Op deze manier kunnen de geiten aan een computer worden aangesloten en kunnen de vereiste metingen in wakkere dieren worden verricht. Hierdoor is er geen effect van anesthetica op de actiepotentialaal.

In ieder experiment wordt tijdens baseline en na infusie van het anti-aritmicum metingen verricht. Parameters die gemeten worden zijn o.a. de geleidingssnelheid, refractaire periode en AF induceerbaarheid. Deze metingen worden in een elektrisch "normale" (sinus ritme) staat uitgevoerd. Vervolgens zal het hart doormiddel van elektrische stimulatie elektrisch geremodelleerd worden, er wordt AF opgewekt. Indien de AF episodes ~ 5 minuten duren wordt elektrische remodellering als compleet beschouwd. Deze elektrische remodellering zal 2 tot 7 dagen duren. In deze fase zal het bovenstaande protocol herhaald worden. Vervolgens zal AF inductie gecontinueerd worden tot de AF episodes ongeveer een duur van ~ 1 uur hebben. Tijdens dit stadium van AF zal het effect op stabiliteit worden bestudeerd door lengte van de AF episodes met en zonder Vernakalant te meten.

Om de werking van Vernakalant beter te begrijpen zal in de geit ook een klasse I en klasse III anti-aritmicum getest worden. Dit betekent dat het dier enkele keren geremodelleerd wordt en weer terugkeert in de staat van het sinus ritme.



Protocol 3,

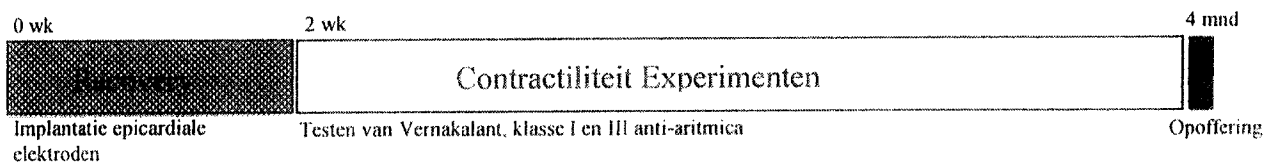
Het effect van Vernakalant op atriale contractiliteit met en zonder contractiele remodelering.

Anesthetica hebben een negatief inotroop effect waardoor verschillen in contractiliteit en arbeid verdwijnen. Daarom wordt in dit protocol voor het AF model in de wakkere geit gekozen. Echter, dit protocol kan niet worden uitgevoerd in studie 2, namelijk de grote hoeveelheid elektroden zal de beweging, en dus contractiliteit, belemmeren.

Middels een open thorax operatie wordt een beperkt aantal elektroden op het rechter en linker atrium en op de ventrikels geïmplant. Om verkorting te meten worden piëzoelektro-kristallen op de linker en rechter atrium geplaatst. De aansluitkabels voor de elektroden en kristallen wordt via de nek naar buiten getunneld. Zodoende kunnen geiten aan een computer worden aangesloten om de vereiste metingen te verrichten. Als de geit hersteld is van de open thorax chirurgie wordt onder een lichte narcose een drukkatheter in het rechter atrium geplaatst. Om longembolieën te voorkomen zal vanaf dat moment dagelijks Fraxiparine subcutaan gegeven worden.

In ieder experiment wordt tijdens baseline en na infusie van het antiaritmicum metingen verricht. Parameters die gemeten worden zijn o.a. het atriale contractie patroon, druk in het rechter atrium, arbeid en refractaire periode. Deze metingen worden in een elektrisch "normale" (sinus ritme) staat uitgevoerd. Vervolgens zal het hart elektrisch geremodelleerd worden doormiddel van elektrische stimulatie, er wordt AF opgewekt. Indien de AF episodes ~ 5 minuten duren wordt elektrische remodelering als compleet beschouwd. Deze elektrische remodelering zal 2 tot 7 dagen duren. Vervolgens zal het bovenstaande protocol herhaald worden.

Om de werking van Vernakalant beter te begrijpen zal in de geit ook een klasse I en klasse III anti-aritmicum getest worden. Hiervoor zullen de dieren enkele keren geremodelleerd worden en weer terugkeren in de staat van het sinus ritme.



Protocol 4,**De anti-aritmische effecten van Vernakalant tijdens verschillende stadia van atriale remodellering.**

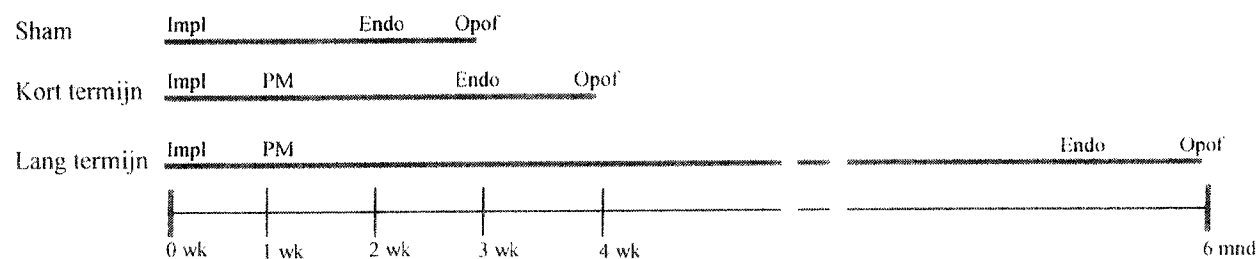
Voor dit protocol worden drie groepen dieren ingezet:

- Sham;
- Kort termijn fibrilleren (~ 3 weken);
- Lang termijn fibrilleren (~ 6 maanden).

Een endocardiale elektrode wordt in het rechter atrium geplaatst, welke wordt aangesloten op een implanteerbare pacemaker. Bij 1 op 8 geiten dislokeert de endocardiale elektrode in de eerste dagen na operatie en komt de elektrode in het ventrikel terecht. In een dergelijk geval zal er één keer her-operatie plaatsvinden. Na een week recovery wordt middels hoog frequente stimulatie AF geïnduceerd.

De week voorafgaand aan het opofferingsexperiment zal de geit onder narcose worden gebracht voor endocardiale metingen zoals de duur van de refractaire periode op verschillende locaties in de atria en AF induceerbaarheid. Deze metingen zullen zowel in het rechter als het linker atrium worden uitgevoerd.

Ten behoeve van het opofferingsexperiment zal de thorax geopend worden. Met behulp van een elektrode met hoge spatiale dichtheid worden activatie kaarten gemeten. Deze activatie kaarten geven informatie over de geleidingseigenschappen en -patronen ten tijde van AF en infusie van Vernakalant. Endo- epicardiale dissociatie zal onderzocht worden in relatie tot stabiliteit van AF.



Impl: implantatie endocardiale lead en pacemaker

PM: start AF inductie

Endo: endocardiale meting van actiepotentialen onder narcose

Opor: open thorax experiment met hoge dichtheid mapping van beide atria

9. Experimentele condities**9a. Anesthesie**

Door een medewerker van CPV groot zal een pre-anesthetisch onderzoek uitgevoerd worden. Voor de operatie 12 uur vasten (geen voer en hooi, huisvesting wel op stro en ad libitum water).

Inductie:

Thiopentalnatrium 10-20 mg/kg i.v.

Onderhoudsanesthesie tijdens druk katheter, pacemaker en epicardiale implantaties:

Algehele anesthesie met Sufentanyl (6 µg/kg/h), Midazolam (0.8mg/kg/h) en eventueel Isofluraan (0,5-1,5%), beademing met Lucht/O₂ (2:1). Sufentanyl zorgt voor de analgesie. Vochtverlies wordt gecompenseerd met ringers lactaat 500 ml/u i.v. Preoperatief: 1 gr Ampicilline i.v. Postoperatief: 1 gr Ampicilline i.m. In geval van epicardiale implantaties zal antibiotica voor 3 dagen gecontinueerd worden. In overleg met de proefdierdeskundige zal een breder spectrum antibioticum regime gekozen worden voor de dieren met een port entre.

Onderhoudsanesthesie tijdens gesloten thorax endocardiale metingen:

Algehele anesthesie met Sufentanyl (6 µg/kg/h), Midazolam (0.8mg/kg/h) en Propofol (10

mg/kg/h) , beademing met Lucht/O₂ (2:1). Sufentanyl zorgt voor de analgesie. Vochtverlies wordt gecompenseerd met ringers lactaat 500 ml/u i.v. Preoperatief: 1 gr Ampicilline i.v. Postoperatief: 1 gr Ampicilline i.m.

Onderhoudsanesthesie tijdens open thorax opofferingsexperimenten: Algehele anesthesie met Sufentanyl (6 µg/kg/h), Midazolam (0,8mg/kg/h), Propofol (10mg/kg/h) en Pavulon (0,3mg/kg/h) beademing met Lucht/O₂ (2:1). Vochtverlies wordt gecompenseerd met ringers lactaat 500 ml/u i.v.

Monitoring:

Tijdens anesthesie zal monitoring van ECG en spirometrie plaatsvinden. Indien ook gebruik gemaakt wordt van spierveslapping (Pavulon) zal ook bloeddruk monitoring worden toegevoegd. Deze mate van monitoring zal voldoende informatie geven om een eventueel gemaskeerde pijn respons te kunnen detecteren.

9b. Pijnbestrijding

Sufentanyl zorgt voor de perioperatieve analgesie. Voor de dieren uit protocol 1 & 4 is de pijnbestrijding alleen tijdens anesthesie afdoende. Voor protocol 2 en 3: dag 1 Buprenorfine 5-10 µg/kg i.m. 2 maal daags i.c.m. Caprofen 2-4 mg/kg s.c. Dag 2 en 3 enkel Caprofen 2-4 mg/kg s.c. Naast pijnbestrijding zal 3 tot 5 dagen antibiotica gegeven worden.

Pijn en gezondheid zal geëvalueerd worden aan de hand van klinische factoren, zoals hartritme, ademhalingsritme en -patroon, gedrag en vacht.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Protocol 1 en 4: Euthanasie zal plaatsvinden onder volledige verdoving; zoals hierboven voor een opofferingsexperiment beschreven is. De thorax wordt aan de linkerzijde geopend, het hart verwijderd waardoor de geit verbloedt.
- Protocol 2 en 3: Euthanasie middels een overdosis penthobarbital.

Humane eindpunten:

- In geval van oncontroleerbare infecties ondanks behandeling met antibiotica. Infecties worden geïdentificeerd door een lichaamstemperatuur boven de 40⁰ C.
- In geval van hevige pijn ondanks de adequate pijnmedicatie. Pijn wordt geïdentificeerd door een opstaande vacht, knarsen tanden en het laten hangen van de kop. Het niet herstellen van de open thorax operatie uit zich in het niet belasten van de linker voorpoot.
- In geval van een gewichtsafname ≥ 20 % t.o.v. het pre-anesthetisch onderzoek. Een toename van lichaamsgewicht ten gevolge van oedeem vorming wordt niet verwacht omdat deze dieren geen hartfalen zullen ontwikkelen.

10a. Ongerief

Protocol 1

Procedure	Duur	Frequentie	Ongerief
Infusie medicijn incl. bloed afname	8 uur	2 X	02
Infusie onder anesthesie incl. wakker worden	2 uur	1 X	03
Terminaal experiment	2 uur	1 X	02
Totaal			03

Protocol 2

Procedure	Duur	Frequentie	Ongerief
Open thorax implantatie incl. recovery	4 uur	1 X	05
AF inductie incl. beperkte bewegingsvrijheid	2-14 dagen	1 X 4 X	03
Medicijn studie, elektrofysiologische metingen	4 uur	~ 10 X	03
Totaal			05

Protocol 3

Procedure	Duur	Frequentie	Ongerief
Open thorax implantatie incl. recovery	4 uur	1 X	05
Implantatie druk katheter	0,5 uur	1 X	02
Fraxiparine injectie sc.	1 min	30 X	02
AF inductie incl. beperkte bewegingsvrijheid	2-14 dagen	~ 5 X	03
Medicijn studie, Contractiliteit metingen	4 uur	~ 10 X	03
Totaal			05

Protocol 4

Procedure	Duur	Frequentie	Ongerief
Pacemaker implantatie incl. wakker worden	2 uur	1 X	03
AF onderhoud	3 weken – 6 maanden	1 X	02
Endocardiale metingen incl. wakker worden	~ 4 uur	1 X	03
Terminaal experiment	~ 8 uur	1 X	02
Totaal			03

10b. Welzijnsevaluatie

De dieren in protocol 2 en 3 krijgen epicardiale elektroden geïmplanteerd. Ten gevolge van de port entr  , is de kans op infectie het grootste risico in dit model. Gedurende de laatste jaren zijn er een aantal veranderingen doorgevoerd om infecties te voorkomen. De operatie procedure en het elektrode ontwerp zijn verbeterd, zodanig dat we nu in staat zijn om infecties te voorkomen voor minstens 3 maanden. Echter, wondverzorging blijft cruciaal voor een succesvol herstel. In DEC protocol 2002-21 hadden 4 van de 20 geiten een behandeling

nodig, omwille van infecties. De open borstkas operatie zal ernstig ongerief veroorzaken (05) maar verder ongerief is beperkt door de veranderingen die we aangebracht hebben in onze procedures.

11. Verzorging en huisvesting

Geiten in protocollen 1 en 4 zullen in de perioden dat er geen experimenten plaatsvinden in de buiten wei in groepshuisvesting gehouden worden. In de binnen stallen zal altijd een *buddy* geit aanwezig zijn.

De geiten in protocol 2 en 3 zullen gehuisvest worden in de binnenstallen van het CPV. Doordat kabels uit de nek van de geit komen, kunnen ze niet in groepshuisvesting. Geiten knabbelen graag aan objecten welke in hun hok bevinden. De elektroden zouden kapot geknaagd worden. De hokken in de proefdier voorziening hebben open hekken waardoor de dieren elkaar wel kunnen waarnemen en dus niet geïsoleerd van elkaar komen te staan. Tijdens de AF inductie procedure zullen de geiten in speciale hokken met beperkte bewegingsvrijheid verblijven. Dit is noodzakelijk om de geit te kunnen verbinden met een computer. Verzorging zal verleend worden door het personeel van CPV en de verantwoordelijke onderzoekers. In geval van urgentie zullen de VO en VVO gecontacteerd worden.

12. Deskundigheid

De verantwoordelijk onderzoeker heeft in de afgelopen jaren ruime ervaring gekregen met metingen in wakkere geiten (farmacologische cardioversie met meting van het ECG en endocardiale signalen), steriele implantatie van pacemakers en opofferingsexperimenten onder anesthesie met open thorax. Ons team beschikt verder over ervaren biotechnici. Zij zijn opgeleid en bedreven in het uitvoeren van geiten chirurgie en anesthesie.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

1) Endocardiale Pacemaker implantatie

Na inductie van anesthesie wordt het operatiegebied geschoren en gedesinfecteerd. De vena jugularis wordt vrij geprepareerd en een endocardiale lead in gebracht. De lead wordt onder röntgen doorlichting in het hart oortje van het rechter atrium geplaatst. Het signaal afkomstig van de lead wordt gecontroleerd op injury current en door lichte tractie wordt gevoeld of de lead goed gefixeerd zit. Indien de pace drempel zich onder 1.5 mA bevindt wordt dit als een juiste plaatsing beschouwd. De lead wordt aangesloten op een fibrillatie pacemaker. De pacemaker wordt in een pocket onder de musculus sternocleidomastoideus geplaatst. De weefsel lagen worden gesloten met resorbeerbaar hechtmateriaal.

NB. In 1 op de 8 gevallen dislokeert de pacemaker lead. Indien dan de pacemaker aan gezet zou worden zou ventrikel fibrilleren worden opgewekt. Daarom wordt in een degelijk geval tot 1 maal een herimplantatie uitgevoerd.

2) Implantatie van epicardiale elektroden (open thorax).

De linker laterale kant van de thorax en de nek worden geschoren en zorgvuldig schoon gemaakt voor chirurgie. Steriliteit is hier groot belang omwille de te maken porte d'entrée. Een incisie wordt gemaakt ongeveer 2 cm caudaal en parallel aan de musculus cleidobrachialis. Deze locatie verzekert een goed zicht op de 4^{de} intercostaal ruimte. Door deze intercostale ruimte zal toegang verkregen worden tot de thorax. Het pericard wordt geopend om toegang te krijgen tot de ventrikels en beide atria. Elektroden matjes en eventueel piezoelektrisch-kristallen worden geplaatst op de vrije wand van beide atria, de Bachmann bundel en op het ventrikel. Om de thorax te sluiten wordt Ticron 5 hechtdraad gebruikt dat de 4^{de} en de 5^{de} rib aaneen zal sluiten. De longen worden opgeblazen en atalactase wordt voorkomen

door PEEP. De intercostale spier en de pectorale spier worden gehecht met resorbeerbaar hechtmateriaal. De kabels van de elektroden worden in een lus gelegd en gefixeerd, met niet resorbeerbaar hechtmateriaal, op de pectorale spier doormiddel van R knopen. Er zal gebruik gemaakt worden van een tunneling tube om de kabels naar de nek te leiden. De kabels worden hier eveneens gefixeerd via niet-resorbeerbare R knopen. Net voor het punt waar de kabels naar buiten komen, worden ze ingepakt in Mersilene mesh, wat het ingroeien van de silicone buis in het weefsel zal bevorderen. De weefsellagen worden gehecht met resorbeerbaar hechtmateriaal. Om het uitwendige deel van de kabels te beschermen krijgen de dieren een jasje aan. Op dit jasje zit een pocket waarin de kabels opgeslagen kunnen worden.

3) Implantatie druk katheter

Onder algehele verdoving wordt percutaan een katheter introductie sheets in vena jugularis geplaatst. Deze wordt gefixeerd met R-knoop hechtingen in de huid. Onder geleide van röntgen wordt de druk sensor in het rechter atrium geplaatst. Om stolsel vorming te voorkomen wordt dagelijks Fraxiparine s.c. gegeven. Ter bescherming van de sheet en katheter wordt deze in een theedoek om de hals verpakt.

3) Toediening anti-arrhythmica experimenten

Een veneuze canule voor toediening van anti-arrhythmica worden in een vene (achterpoot of hals) geplaatst. Bij een rustige geit wordt een stuwband om de poot aangebracht en wordt de vene aangeprikt met een Braunule. Bij een onrustige geit assisteert een tweede persoon, die het vat stuwt en de geit fixeert terwijl de eerste persoon de Braunule in brengt. De Braunule wordt hierna gefixeerd met tape. Een antiarrhythmicum kan dan in een bolus en/of een continu infuus worden toegediend. Op dezelfde manier wordt een tweede Braunule geplaatst voor bloedafnames. Een rubber band met zilveren contact-elektroden wordt om de borstkas aangebracht om het ECG af te leiden. Tegelijkertijd worden signalen van ventriculaire en atriale elektroden gemeten. Deze signalen worden continu geanalyseerd, zodat het RR interval, de QT tijd en de AF cyclus lengte direct kunnen worden gevolgd. Het experiment wordt voortijdig beëindigd indien 100% verlenging van de QRS-duur gemeten wordt, of als er ventriculaire tachycardie of aritmiën optreden.

4) Opoffering met elektrofysiologische metingen

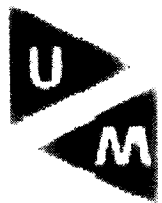
De thorax wordt open gemaakt via een links-zijdige opening. De 5^{de} rib wordt verwijderd om het zicht op het hart en de eerder geplaatste elektroden te verhogen. Hierna worden elektrofysiologische metingen gedaan om de geleiding in het hart in kaart te brengen (geleidings-snelheid, patroon en refractaire periode). Aan het eind van deze metingen wordt een bolus van 25.000 units heparine gegeven en wordt het hart uitgeknipt, waardoor de geit verbloedt.

Relevante literatuur

Referenties:

1. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal. *Physiol. Rev.* 91: 265-325.
2. Fedida D, Orth P, Chen J, Lin S, Plouvier B, Jung G, Ezrin A, Beatch G. The mechanism of atrial antiarrhythmic action of RSD 1235. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005 Nov;16(11):1227-38.
3. Camm J, Capucci A, Hohnloser S, Torp-pedersen C, Van Gelder I, Mangal B, Beatch G. A randomized active-controlled study comparing the efficacy and safety of Vernakalant to Amiodorone in recent-onset atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Jan 18;57(3):313-21.
4. Pratt C, Roy D, Torp-Pederson C, Wyse D, Toft E, Juul-Moller S, Retyk E, Drenning D. Usefulness of Vernakalant hydrochloride injection for rapid conversion of atrial

fibrillation. Am J Cardiol. 2010 Nov 1;106(9):1277-83



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, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“Vernakalant, de effecten op atriale en ventriculaire elektrofysiologie en hemodynamica en het mechanisme van terminatie van atrium fibrilleren in het model van de geit”*, is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC vraagt zich af of de dieren uit protocol 1 worden hergebruikt of worden geëuthanaseerd?
- Waarom kunnen de dieren uit protocol 1 niet hergebruikt worden in protocol 2, 3 of 4, teneinde het aantal dieren te reduceren?
- De DEC verzoekt bij punt 10a ook de contractiliteitsexperimenten 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 2011-065, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Geachte leden van de DEC,

In reactie op uw opmerkingen op DEC aanvraag 2011-065 stuur ik u deze brief. De antwoorden staan bij de vragen geformuleerd. Eventuele wijzigingen zijn in het dec protocol in grijs gearceerd.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC vraagt zich af of de dieren uit protocol 1 worden hergebruikt of worden geëuthanaseerd? *De dieren uit protocol 1 worden na afloop van het tweede experiment onder anesthesie geëuthanaseerd. Dit staat vermeld onder punt 9C eerste punt.*
- Waarom kunnen de dieren uit protocol 1 niet hergebruikt worden in protocol 2, 3 of 4, teneinde het aantal dieren te reduceren? *Deze studie bestaat uit verschillende fasen waarin we Vernakalant bestuderen. In protocol 1 wordt bepaald welke doseringen voor de verschillende experimenten worden gebruikt. Daarom dient logischerwijs hiermee gestart te worden. De kennis die we opdoen in met name protocol 2, maar ook in protocol 3, wordt gebruikt om de metingen in protocol 4 te verfijnen. Hierdoor zijn alleen dieren binnen protocol 2 en 3 kandidaat om protocol 1 uit te voeren. Deze dieren ondervinden ernstig ongerief. Aan dit ernstige ongerief zou nog twee maal recovery van narcose, ongerief score 03, worden toe gevoegd. In onze ethische weging geven we de voorkeur aan een toename van 5 dieren ipv een additionele toename van ongerief bij dieren welke al ernstig ongerief ondergaan. Daarom hebben we gekozen om deze dieren in een aparte groep te plaatsen.*
- De DEC verzoekt bij punt 10a ook de contractiliteitsexperimenten te vermelden. *Dit punt stond al vermeld in het tabel onder de noemer medicijn studie. Ter verheldering staat nu in de tabellen 2 en 3 vermeld welke metingen tijdens de medicijn studie worden verricht.*

Ik hoop bij deze uw vragen naar tevredenheid te hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
30-05-2011

*Project: Vernakalant, de effecten op atriale en ventriculaire
elektrofysiologie en hemodynamica en het mechanisme van terminatie van
atrium fibrilleren in het model van de geit.*

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: 2011-065
Diersoort: geit
Aantal dieren: 87
Einddatum: 28-05-2015

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