

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-149

Versie 2006:

Herziene versie

Ontvangen: 24-11-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
30-11-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	SAPHIR	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	--------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

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

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

Budgetnummer	30983293B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Remming van specifieke endotheline-varianten

startdatum 1-12-2011

einddatum⁹ 30-11-2015Duur van de proef¹⁰:

1 dag

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegd- heid 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. P.I.				Art.9	

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	Exp						
Diersoort	02						
Stam	WKY						
Construct / mutatie ?	Nee						
Herkomst (leverancier) *	01						
Aantal	330						
Geslacht	Man						
Dieren immuuncompetent ?	Ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	16 weken						
Doel van de proef *	31						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	02						
Anesthesie *	01						
Pijnbestrijding *	01						
Mate ongerief *	01						
Toestand dier einde exp*	01						

* VHL-coderingen zie bijlage

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Remming van specifieke endotheline-varianten

1. Doel van de proef.

De bloeddruk in het menselijk lichaam wordt gereguleerd door, onder andere, de weerstand die het bloed in bloedvaten ondervindt. Deze weerstand wordt bepaald door de contractiele status van weerstandsvaten. Deze vaten bestaan uit endotheelcellen, gladde spiercellen en bijv. sensor-motorzenuwen.

Endotheelcellen produceren vaso-actieve stoffen en kunnen daardoor de contractiele status van de bloedvaten beïnvloeden. Eén van de door endotheelcellen geproduceerde is endotheline-1 (ET-1). ET-1 bindt aan twee receptoren: ET_A en ET_B. Wanneer ET-1 bindt aan de ET_A-receptoren, die zich voornamelijk op de gladde spiercellen bevinden, trekken de gladde spiercellen samen. Wanneer ET-1 bindt aan de ET_B-receptoren, die zich vooral op de endotheelcellen, resulteert dit in een relaxatie van de gladde spiercellen door dat de gladde spiercellen NO zullen uitscheiden.

Activatie van receptoren wordt in de farmacologie gezien als een tijdelijk fenomeen. De receptor wordt actief wanneer de agonist (de activerende stof) bindt en activatie stopt als de agonist wordt verwijderd. Echter, in tegenstelling tot dit klassieke model van receptor-activatie stopt de activatie van de ET_A-receptor niet, wanneer ET-1 (de agonist) wordt verwijderd.

De continue receptoractivatie van de ET_A-receptor wordt veroorzaakt door onomkeerbaar binden van een deel van ET-1 aan een deel van de receptor. Andere endothelines, ET-2 en ET-3, hebben een ander mechanisme van receptoractivatie, maar binden wel onomkeerbaar. Recent werk in ons lab heeft aangetoond dat antagonist (stoffen die wel op de receptor binden, maar niet activeren) verschillende effecten hebben tegen de verschillende endothelines (ET-1, ET-2 en ET-3).

Hypertensie, een aandoening gekenmerkt door onder andere verhoogde activiteit van het ET-systeem, is een groeiend probleem. Een beter begrip van de mechanismen, waarmee de verschillende endothelines hun receptor activeren en hoe een antagonist tegen een specifieke endotheline kan werken, kan leiden tot een betere behandeling van hypertensie en andere ET-gerelateerde aandoeningen.

Daarom test dit project de volgende hypothese:

Slim ontworpen antagonist kunnen de werking van een specifieke endotheline beter remmen dan antagonist tegen alle endothelines.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Weerstandsvaten spelen een belangrijke rol bij de bloeddrukregulatie. Wanneer deze rol wordt verstoord, resulteert dit in hoge bloeddruk.

Hoge bloeddruk kan bijdragen aan het ontstaan van ernstige ziektebeelden zoals hart- en nierfalen, herseninfarct en atherosclerose. Daarom is er vraag naar middelen die de bloeddruk verlagen. Wij verwachten hier een bijdrage aan te kunnen leveren met de experimenten die we gepland hebben.

3. Alternatieven

Vervanging: de effecten van vasoactieve stoffen kunnen alleen op geïsoleerde, levende bloedvaten

van een gewerveld diermodel worden getest, omdat alleen dit inzicht levert in de effecten van de farmaca op de bloedvaten als systeem in het geheel.

Vermindering: gezien de onomkeerbaarheid van de binding van endothelines aan de ET_A-receptor, kan er geen seriële, 2^{de} toevoeging van endothelines aan het bloedvat gebeuren. Waar mogelijk worden de experimenten wel serieel uitgevoerd.

Verfijning: de dieren worden opgeofferd voorafgaand aan de experimenten. De opoffering gebeurt op een zo humaan mogelijke manier, waarbij de fysiologie van de bloedvaten gewaarborgd blijft.

4. Ethische afweging

Hypertensie en andere cardiovasculaire aandoeningen zijn de voornaamste doodsoorzaken in onze westerse wereld. Dit onderzoek kan leiden tot medicijnen die een nieuw aspect van bloeddrukregulatie aanpakken, namelijk langdurige vasoconstrictie geïnduceerd door endothelines, om zo hypertensie te behandelen. Vanwege het sterke maatschappelijke en wetenschappelijke belang van deze proef en rekening houdend met het geringe ongerief voor de rat is de keuze voor dit proefdier te rechtvaardigen.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Endotheline-1 (ET-1) is een, onder andere door endotheelcellen geproduceerde vasoconstrictor (Yanagisawa, 1988). Verder is er in het lichaam een rol voor ET-1 bij inflammatie, celdeling en zorgt voor proliferatie van verschillende celtypen wat bijv. hypertrofie van de vaatwand in de hand werkt. De rol van ET-2 en ET-3 in deze processen wordt ook steeds meer erkend.

De effecten van ET-1 worden gekenmerkt door een lange duur. Zowel in weefselpreparaten (Meens, 2010) als *in vivo* (Meens, 2011) zorgt het bijv. voor langdurige contracties van gladde spiercellen in de vaatwand. Dit leidt, *in vivo*, vervolgens tot langdurige bloeddrukstijging.

De langdurige effecten van endothelines maken de huidige therapieën (zoals de bestaande ET-receptor antagonisten) niet geschikt om op korte termijn iets te doen aan bijv. hypertensie, die veroorzaakt worden een verhoogde activiteit van het ET systeem (Kohan, 2008). Daarbij kan een antagonist, gericht tegen 1 van de 3 endothelines, door specificiteit een betere werking hebben en mogelijke bijwerkingen beperken.

Wij hebben daarom beschikking over een aantal “klassieke antagonist”, gericht tegen alle endothelines en over een aantal “nieuwe antagonist”, die mogelijk meer specificiteit tegen één bepaalde endotheline hebben. Uit eerder onderzoek blijkt dat de verschillende endothelines op verschillende manieren de ET_A-receptoren activeren. De nieuwe antagonist kunnen daarom mogelijk meer optreden tegen een door ET-2-geactiveerde receptor en minder tegen een door ET-1-geactiveerde receptor.

Dit kan bij behandeling van ET-gerelateerde aandoeningen belangrijk zijn, omdat het remmen van specifieke endothelines een effectievere behandeling mogelijk kan maken. Daarnaast kan een verminderd effect op andere endothelines zorgen voor een mogelijke afname van bijwerkingen.

Daarom test dit project de volgende hypothese:

Slim ontworpen antagonist kunnen de werking van een specifieke endotheline beter remmen dan antagonist tegen alle endothelines.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project maakt deel uit van het Nederlandse Top Institute Pharma, waardoor het onderzoeksonderwerp beoordeeld en akkoord bevonden is door de Federatie voor Innovatief Geneesmiddel Onderzoek Nederland (FIGON).

Deze DEC-aanvraag is beoordeeld en akkoord bevonden door een PI bij CARIM.

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

We maken gebruik van 16 weken oude WKY ratten van een erkende fokinstelling. We kiezen voor WKY ratten omdat dit een veelgebruikte stam is in het betreffende onderzoeksveld, en onze eerdere experimenten met de klassieke antagonisten (zie wetenschappelijke onderbouwing) zijn op hetzelfde materiaal uitgevoerd. De dieren zullen voor de proef opgeofferd worden

7b. Sexe

Er zijn grote verschillen tussen mannen en vrouwen wat betreft het risico op het ontstaan van cardiovasculaire aandoeningen, mannen lopen een groter risico. Mogelijk speelt ET-1 bij dit verschil een rol (Tostes et al., 2008).

7.c. Aantallen

Om de hypothese te kunnen testen willen we de response van de bloedvaten op 6 endotheline varianten toetsen, alsook de remming van de endotheline-effecten door 5 verschillende antagonisten. We hebben dus $6 \times 5 = 30$ groepen nodig.

De werking van de antagonisten wordt aan de hand van verschillende concentraties bepaald. Hier zijn een aantal bloedvaten per dier voor nodig. Het aantal geschikte aftakkingen van de arteria mesenterica cranialis per dier is beperkt en zullen dus allen gebruikt worden om de onderlinge verschillen tussen de een aantal bekende agonisten van deze ET_A -receptor te bepalen. Deze verschillen hebben niet alleen te maken met het maximale effect van de stof, maar zeker ook met de mate waarmee de stof de gevoeligheid van de receptor voor de agonist beïnvloedt. Het effect op gevoeligheid kan enkel worden bepaald door het gebruik van dosis-werkingscurves met verschillende concentraties van de stoffen. Op deze manier wordt het beste beeld van de werking van een antagonist verkregen. Daarom achten wij het aantal groepen gerechtvaardigd.

Bij eerdere experimenten met geïsoleerde kleine arteriën (functioneel onderzoek van arteriën van de rat) werd een SEM gevonden van circa 10% van het gemiddelde bij een groepsgrootte van $n=8$. Dit betekent een variatiecoëfficiënt van $\sqrt{8-1} \times 10 \approx 25\%$. Bij berekening van het benodigde aantal proefdieren voor een verantwoorde proefdieropzet is gebruik gemaakt van de Powerberekening uit het Handboek Proefdierkunde. Bij een tweezijdige toetsing met een Student's T-toets met een betrouwbaarheidsdrempel van 5% ($\alpha=0.05$) en een onderscheidingsvermogen van 80% ($\pi=0.8$) geldt:

$$(z_{\alpha/2} - z_{\pi}) = \sqrt{(n/2)} * (\mu_1 - \mu_2) / \sigma.$$

De z-punten van de gestandaardiseerde normaalverdeling zijn. $z_{0.025}=1.96$ en $z_{0.8}=-0.84$. In de experimenten willen wij een verschil tussen de twee testgroepen kunnen meten van 30% dus $(\mu_1 - \mu_2)=30$ en $\sigma=25$ zoals boven reeds berekend. Invullen geeft $1.96 - (-0.84) = \sqrt{(n/2)} * 30/25 \rightarrow \sqrt{(n/2)} = 2.8/1.2 \rightarrow \sqrt{(n/2)} = 2.33 \rightarrow n/2 = 5.4 \rightarrow n=11$.

Totaal aantal dieren: 30 (groepen) * 11 (groepsgrote) = 330 mannelijke dieren.

6 Dierproef

8. Experiment

Myograaf experimenten (WKY, n=11, per groep)

Mesenteriale weerstandsarteriën (2^{de} orde aftakking van de *arteria mesenterica cranialis*) worden geïsoleerd en in een orgaanbad gemonteerd tussen een micrometerschroef en een isometrische krachtopnemer. In deze setting zal de invloed van de volgende farmaca worden getoetst:

- ET-1
- ET-2
- ET-3
- VIC (variant van ET-2)
- Trp⁶ET-1 (kruising #1 tussen ET-1 en ET-2)
- Leu⁷ET-1 (kruising #2 tussen ET-1 en ET-2)

Op elk van deze endotheline-varianten zullen vervolgens de effecten van de volgende antagonisten worden getest:

- ET_A-antagonist 1 ()
- ET_A-antagonist 2 ()
- ET_{A/B}-antagonist 1 ()
- ET_{A/B}-antagonist 2 ()
- ET_A/AT₁-antagonist ()

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De ratten zullen worden opgeofferd in het kader van de proef door middel van CO₂/O₂ inhalatie.

9b. Pijnbestrijding

De dieren worden opgeofferd met CO₂/O₂ inhalatie. Hierbij wordt geen gebruik gemaakt van pijnbestrijding, omdat dergelijke middelen gevolgen kunnen hebben op de karakteristieken van de interactie tussen ET-1 en de ET_A-receptor en dus op de metingen.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De ratten zullen op week 16 na geboorte worden opgeofferd door middel van CO₂/O₂ inhalatie. Indien voortijdig complicaties optreden zullen de dieren voortijdig geëuthanaseerd worden door de op het voorblad genoemde VO. Hierbij wordt gelet op algemene klinische verschijnselen bij het dier:

1. Gedrag (scoren op reactie op prikkels, back arch, twitch, wincing en whrite)
2. Houding
3. Gang/ mobiliteit
4. Verzorgingstoestand
5. lichaamsgewicht
6. andere in het oog springende afwijkingen

Op deze punten worden scores toegekend (0= normaal, 1= geringe afwijking, 2= matige afwijking, 3= ernstige afwijking). Bij een score van 3 op een 1 onderdeel of bij een combinatie van scores groter dan 3 zal het dier worden geëuthanaseerd.

10a. Ongerief



Mate van ongerief: doden zonder voorafgaande handelingen: code 01.

10b. Welzijnsevaluatie

-

11. Verzorging en huisvesting

Verzorging en huisvesting van de ratten vindt plaats volgens de normen van de centrale proefdiervoorziening aan de UM. De ratten zullen in groepshuisvesting gevestigd worden, met ad libitum voer en water. Bij calamiteiten zal de art. 14 gewaarschuwd worden.

12. Deskundigheid

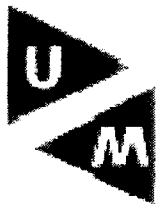
Het laboratorium, de VO en de VVO beschikken over ruime ervaring met de hierboven beschreven experimentele technieken.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

-

Relevante literatuur

- Yanagisawa M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988 Mar 31;332(6163):411-5.
- Meens MJPMT, Compeer MG, Hackeng TM, van Zandvoort MA, Janssen BJA, et al. (2010) Stimuli of Sensory-Motor Nerves Terminate Arterial Contractile Effects of Endothelin-1 by CGRP and Dissociation of ET-1/ETA-Receptor Complexes. PLoS ONE 5(6): e10917. doi:10.1371/journal.pone.0010917
- Meens MJ, Mattheij NJ, Nelissen J, Lemkens P, Compeer MG, Janssen BJ, De Mey JG, Calcitonin Gene-Related Peptide Terminates Long-Lasting Vasopressor Responses to Endothelin 1 In Vivo. Hypertension 2011, epub ahead of print
- Kohan D Endothelin-1 and hypertension: from bench to bedside. Curr Hypertens Rep. 2008 Feb;10(1):65-9. Review.
- Tostes RC et al. Endothelin, sex and hypertension. Clin Sci (Lond). 2008 Jan;114(2):85-97. Review



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, 24-11-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Remming van specifieke endotheline-varianten*", is op de DEC vergadering van 18 november 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De DEC verzoekt de naam bij punt 6 te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat er verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 2) De DEC vraagt zich af of het mogelijk is om de vaten, geïsoleerd uit 1 dier, eerst te testen voor de hoogste concentratie. Voor stoffen met een gewenst effect, kan vervolgens een doses respons curve gemaakt worden (dit in het kader van vermindering van het aantal proefdieren).

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 **2011-149**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 24/11/2011

Geachte ...

Bijgevoegd vindt u projectvoorstel 2011-149 genaamd "Remming van specifieke endotheline-varianten".

Graag wil ik hierbij ingaan op de door de DEC verzochte aanpassingen.

- Bij punt 6 verzoekt de DEC de naam te verwijderen. Dit is gewijzigd en omschreven als "een PI bij CARIM".
- In het kader van vermindering vraagt de DEC zich af of het mogelijk is om de vaten, geïsoleerd uit 1 dier, eerst te testen voor de hoogste concentratie en om vervolgens een dosis-werkingscurve te maken van de stoffen die een gewenst effect hebben.

Hopend de DEC hiermee voldoende te woord hebben gestaan, wacht ik de beslissing af.

Hoogachtend,

Department of
Faculty of Medicine, Health & Life Science

Aan:

Ons kenmerk *Doorkiesnummer* *Maastricht*
30-11-2011

Project: Remming van specifieke endotheline-varianten.

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: 2011-149
Diersoort: rat
Aantal dieren: 330
Einddatum: 30-11-2015

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