

143

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM⁸

Versie 2006

Nieuw

DECNR: 2011-145

Ontvangen: 14-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²
09-11-2011	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	30981120B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Het effect van paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen op in vivo extrahepatische trombusvorming

startdatum 01-11-2011

einddatum⁹ 01-11-2012

Duur van de proef¹⁰: 24 uur

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

Diergroep (protocol)	1	2	3		
ctrl/exp/sham					
Diersoort	01	01	01		
Stam	Balb/C	Balb/C	Balb/C		
Construct / mutatie ?					
Herkomst (leverancier) *	02	02	02		
Aantal	11	11	11		
Geslacht	m	m	m		
Dieren immuuncompetent ?	ja	Ja	ja		
Leeftijd/gewicht	8-10 weken	8-10 weken	8-10 weken		
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 *	01	04	01		
Mate ongerief *	01	03	03		
Toestand dier einde exp*	01	01	01		

* VHI-coderingen zie bijlage

Deelproject aanvraag

Projectnummer: **5895F**
Ontvangst: 12-09-2011

I Project Onderzoek• Aanvrager

Naam :
Organisatie/Eenheid :
Onderafdeling :
Adres :
Postcode :
Plaats :
Telefoon :
E-mail :
Vergunninghouder : [1] RUG

• Algemeen

Titel basisproject : De rol van het hemostatisch systeem in paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen
Aanvang basisproject : 01-05-2010
Gewenste duur : 3 jaar
Voorgaande (deel)project(en) : 5772A, 5320
Geldstroom : [1] 1e geldstroom
Subsidiegever : UMCG

• Eind- of medeverantwoordelijke

Titel en naam :

• Andere personen betrokken bij de handelingen aan proefdieren

Naam	Functie
	Artikel 9 Onderzoeker
	Artikel 12 Functionaris
	Artikel 9 Onderzoeker
	Artikel 9 Onderzoeker

Deelproject• Algemeen

Titel deelproject : Het effect van paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen op in vivo extrahepatische trombusvorming
Aanvang deelproject : 01-11-2011
Gewenste duur : 1 jaar

II Onderzoeksopzet• Behaalde resultaten

Intrahepatische stolselvorming draagt bij aan progressie van leverfalen, en interventies gericht op het verminderen of voorkomen van deze stolsels verminderen paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen in muizen. We hebben grote hoeveelheden bloedplaatjes en fibrine aangetoond in levers van muizen met acuut leverfalen, en deze intrahepatische stolsels worden ook in biopten van mensen gezien. Er is dus intrahepatische activatie van de hemostase, ondanks de grote hemostatische veranderingen geassocieerd met acuut leverfalen. Het is echter nog onbekend welke gevolgen de hemostatische veranderingen in acuut leverfalen heeft voor extrahepatische trombusvorming. Er is indirect in vitro en klinisch bewijs dat het hemostatisch systeem in acuut leverfalen in een 'herbalans' is door het gelijktijdig falen van pro- en antihemostatische systemen (Semin Thromb Hemost. 2010 Jun;36(4):437-43. Blood. 2010 Aug 12;116(6):878-85. doi:10.1016/j.jhep.2011.04.020). Er is echter nog geen in vivo bewijs voor een intacte extrahepatische hemostase in patienten met acuut leverfalen. Een beter inzicht in extrahepatische trombusvorming is noodzakelijk in het licht van de hemostatische complicaties van deze patienten; zowel bloedingen als tromboses kunnen de behandeling van acuut leverfalen bemoeilijken. Bovendien is een beter begrip van de extrahepatische hemostase nodig voor verdere experimenten in dit project waarin we progressie van acuut leverfalen proberen te remmen door toediening van medicijnen die specifieke hemostatische processen remmen (zoals in voorgaande deelprojecten). De interventies die mogelijk klinisch toepasbaar zijn moeten progressie van leverfalen remmen zonder aanleiding te geven tot bloeding complicaties. Een beter begrip van de extrahepatische hemostase in acuut leverfalen kan de grenzen waarbinnen antihemostatische therapie zonder bloedingsrisico kan worden toegepast beter definiëren. Met andere woorden, als we in dit deelproject intacte extrahepatische hemostase aantonen kunnen we meer typen antihemostatische interventies testen dan wanneer een gestoorde extrahepatische hemostase zou worden aangetoond. In dat laatste geval zullen bepaalde typen interventies een onverantwoord groot bloedingsrisico met zich mee brengen.

- *Vraagstelling van het deelproject*

Hoe is de in vivo extrahepatische trombusvorming in muizen met acuut leverfalen in vergelijking met gezonde controle muizen. De hypothese is dat trombusvorming intact of wellicht zelfs supranormaal is. Het is echter niet uit te sluiten dat trombusvorming in acuut leverfalen toch gestoord is door de trombocytopenie en stollingsstoornissen; in dit geval is de theorie van hemostatische herbalans in acuut leverfalen onjuist.

- *Onderzoeksoepzet*

In vivo trombusvorming door applicatie van ijzerchloride op de arterie carotis communis zal bestudeerd worden in:

- 1) Niet behandelde Balb/C muizen (n=11)
- 2) 6 uur na een paracetamol injectie (n=11)
- 3) 24 uur na een paracetamol injectie (n=11)

- *Beschrijving van de uitvoering van de experimenten*

Mannelijke, 8-10 weken oude Balb/C muizen worden overnacht gevast (wel toegang tot drinkwater) en behandeld met een eenmalige i.p. injectie paracetamol (200 mg/kg). Controle muizen worden niet gevast. Zes uur na paracetamol injectie wordt de 24 uren groep weer gevoed, en wordt de 6 uren groep meteen blootgesteld aan de meting van trombusvorming in de beschadigde carotis.

Voor het trombusvormings experiment worden muizen eerst onder anesthesie gebracht (0.1 mg/g Ketamine + 0.02 mg/g Xylazine, de eerste 30 minuten, gevolgd door 2.67 microliter/uur/g via een sc catheter in de nek). Onder anesthesie worden de ogen behandeld met zalf (Visagel), de nek en hals geschoren, een rectaalprobe ingebracht om de lichaamstemperatuur tijdens het experiment op 37 graden te houden, een incisie in de hals gemaakt waarna de arteria carotis wordt vrijgeprepareerd. De carotis wordt beschadigd door een in 1 M ijzerchloride gedrenkt filterpapierje van 1 bij 2 mm aan te brengen.

Op de arterie wordt een microvasculaire flow probe aangebracht om de vorming van een occlusieve trombus in real time te volgen (~30 minuten). Wanneer gedurende enkele minuten geen flow meer wordt waargenomen wordt de muis getermineerd door middel van cardiale bloedafname, waarna de arterie carotis wordt uitgenomen voor histologische analyses.

- **Ongerief voor dieren**

Handeling	Ongerief
Acuut leverfalen door paracetamol injectie	[3] matig
In dit model wordt een niet lethale injectie (i.p.) met paracetamol gegeven. Het ongerief bestaat uit: 1) het overnachten vasten van vast voedsel voor de paracetamol injectie, 2) een eenmalige i.p. injectie, 3) Tijdelijke klinische symptomen door het acuut leverfalen. We zien in dit model gedurende +/- 3 uur duidelijk verminderd actieve muizen. De muizen zijn als ze in deze periode gestimuleerd worden (b.v. door aanraking) wel te activeren. Na deze 3 uur is het gedrag van de muizen weer volledig normaal, en dit blijft zo tot aan het einde van de proef (typisch na 24 uur).	

Het vasten voor paracetamol injectie zorgt voor een sterke reductie in de spreiding van leverschade tussen verschillende dieren en zorgt er bovendien voor dat de schade veel consistentier is tussen de verschillende experimenten. Het extra ongerief door het vasten weegt mijns inziens dus op tegen de sterke reductie van het aantal dieren per groep dat hiermee wordt bereikt.

Terminatie onder anesthesie	[1] gering
De muizen worden onder isofluraan/O ₂ anesthesie verbloed door middel van cardiale bloedafname	
* Analyse van trombusvorming in de beschadigde arterie	[1] gering

carotis

Onder anesthesie wordt een incisie in de nek gemaakt, de carotis vrijgeprepareerd, en wordt de carotis beschadigd door het aanbrengen van een ijzerchloride oplossing. Binnen ~30 minuten wordt een occlusieve trombus gevormd en wordt de muis getermineerd zonder te ontwaken uit de narcose. Deze handeling wordt dus volledig onder anesthesie verricht en wordt daarom beoordeeld met ongeriefcode 1.

Totaal ongerief deelproject

[3] matig

Toelichting

Het ongerief in het voorgestelde experiment bestaat uit:

- 1) Eenmalige i.p. injectie met paracetamol
- 2) De symptomen als gevolg van een niet-lethale paracetamol intoxicatie. deze symptomen houden ~3 uur aan en zijn in onze ervaring voorspelbaar en reproduceerbaar.
- 3) Bepaling van trombusvorming in de carotis gevolgd door terminatie onder 1 anesthesie moment.

Het totale ongerief wordt met name bepaald door de symptomen als gevolg van de paracetamol intoxicatie en de i.p. injectie. Het totale ongerief beoordeel ik met 3.

Verfijning van uitvoering

Op basis van literatuur en eigen ervaring is pijnbestrijding niet nodig en zal niet worden toegepast.

- **Dieren: soort(en) en aantal(len) voor de periode van dit deelproject**

Diersoort	Stam	Inteelt	Aantal
Muizen	BALB/c	Inteelt	33

Motivering aantal dieren

Er zullen 11 niet-behandelde muizen worden vergeleken met 11 muizen die behandeld zijn met paracetamol voor 6 of 24 uur. De groepsgrootte van 11 is gebaseerd op een 25% verschil in labwaarden (ALT, AST, LDH) bij een geschatte standaarddeviatie van 15% en een power van 90%, en een verwachte uitval van 2 muizen per groep (op basis van ervaring in voorgaande experimenten).

Vermindering van aantallen

Er is overwogen om maar naar 1 tijdstip na paracetamol injectie te geven. Echter, de leverfunctie (en dus de hemostatische profielen) zijn sterk verschillend op beide tijdstippen en kennis van extrahepatische hemostatische capaciteit in verschillende fasen van acuut leverfalen zijn relevant voor toekomstige experimenten.

III Proefdierkundige gegevens

- **Dieren: herkomst en huisvesting**

Herkomst van dieren

[1] aankoop

Toelichting herkomst van dieren

Harlan

Dieren uit ander onderzoek

nvt

Afwijkende huisvesting

nvt

Locatie van de experimenten

[9] Elders nl.

Elders

Deze experimenten zullen worden uitgevoerd aan de Universiteit van Maastricht in samenwerking met

J.G.M.

die jarenlange ervaring hebben met het bestuderen van trombusvorming in muizen.

Anesthesie en pijnbestrijding**Anesthesie**

[4] wordt toegepast

Welke of waarom niet

0.1 mg/g Ketamine en 0.02 mg/g Xylazine s.c. als inductie, na een half uur gevolgd door 2,67 microliter/uur/g Ketamine (via een infuuspomp gekoppeld aan een s.c. catheter in de nek).

Pijnbestrijding (per- en) postoperatief

[1] wordt niet toegepast (geen aanleiding)

Zo ja: Welke

Diersoort	Medicament	Dosering (mg/kg)	Route	Interval (uur)
-----------	------------	------------------	-------	----------------

Eventuele andere pijnbestrijding

nvt

Toedieningsschema: frequentie en periode

nvt

Einde experiment**Toestand dier na proef**

[1] dood in kader van de proef

Indicaties humane eindpunten

Omdat deze proef maximaal 24 uur duurt zal met name afwijkend gedrag worden gemonitord. Voortijdige terminatie zal plaatsvinden bij langdurig (>6 uur) verminderd alert zijn, of bij volledig lethargisch gedrag (= niet meer aan te sporen door b.v. aanraking).

Wijze van termineren

Cardiale bloedafname onder anesthesie.

IV Biotechnologie

Type	Nummer en specificatie
------	------------------------

From:
Sent: vrijdag 14 oktober 2011 12:29
To:
Subject: dec-protocol Groningen
Attachments: Voorblad project i.doc; DEC5895F.pdf; DEC goedkeuring.ppt

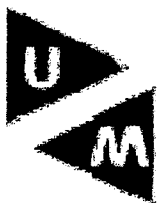
Geachte

Hierbij stuur ik u het dec-protocol van , werkzaam bij de afdeling - an het Universitair Medisch Centrum Groningen. Het is de bedoeling dat de experimenten beschreven in dit protocol hier in Maastricht worden uitgevoerd. De DEC van het UMCG heeft het protocol al goedgekeurd. Deze DEC stuurt echter geen officiële goedkeuringsbrief of mail, maar bevestigt de goedkeuring in een registratie systeem. In bijgaande powerpoint bevindt zich een afdruk van deze goedkeuringsbevestiging. Tevens waren er twee voorwaarden verbonden aan de goedkeuring – deze staan ook in de powerpoint vermeld.

Ik heb afgelopen woensdag kort met gesproken over de te volgen procedure binnen de UM, en zij vertelde mij dat ik alleen een extra voorblad dien aan te leveren. Dit heb ik ook bijgevoegd. Ik ben alleen niet zeker of ik nu zelf als VO op het voorblad mag staan, omdat ik in het dec-protocol alleen zijdelings genoemd sta. Zou u kunnen nagaan of ik het voorblad juist heb ingevuld?

Als ik het verder goed heb begrepen, dient de DEC van de UM dit protocol wel goed te keuren, omdat hier experimenten uitgevoerd gaan worden. Maar zij hoeft dit niet meer ethisch te toetsen, omdat dit al in Groningen is gebeurd. Waarschijnlijk kan het daarom ook kort behandeld worden. Mijn vraag is of het mogelijk is om dit protocol nog voor de komende DEC vergadering aan te bieden? Dit geeft ons de mogelijkheid om de experimenten op korte termijn in te plannen. Als ik verder nog stukken dien aan te leveren of aan te passen, hoor ik het graag. Alvast bedankt voor alle hulp, en een prettig weekend.

Met vriendelijke groeten,



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, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Het effect van paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen op in vivo extrahepatische trombusvorming*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC-UM wenst een onderbouwing voor de power van 90%.
- De DEC-UM vraagt zich af hoe het vasten praktisch wordt uitgevoerd (er staat in de DEC overnacht vasten)? In de Universiteit Maastricht wordt ervoor gezorgd dat de dieren gedurende de eerste schemerperiode nog kunnen eten (of het voer 4 uur voor de aanvang van het experiment wegnemen of overnacht beperkt voeren of voer 's avonds laat wegnemen). Waarom wordt de controlegroep niet gevast?
- Zijn alle personen die vermeld zijn uit Groningen art.9/12 bevoegd GCG)?

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 2011-145, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Geachte leden van de DEC,

Ik dank u voor het beoordelen van aanvraag 2011-145 "Het effect van paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen op in vivo extrahepatische trombusvorming". Een puntsgewijze respons op de vragen in uw brief van 26 oktober vindt u hieronder.

- De DEC-UM wenst een onderbouwing voor de power van 90%.

De keuze voor de power is in feite arbitrair, waardoor een gedegen onderbouwing per definitie onmogelijk is. De keuze voor een power van 90%, en bijvoorbeeld niet voor een power van 80% (een keuze die ook gangbaar is) is gebaseerd op het volgende. Wanneer er in werkelijkheid een effect bestaat, is de kans dat dit effect ook wordt aangetoond groter bij een power van 90%. Ik realiseer me dat het aantal dieren per groep toeneemt wanneer de power op 90% en bijvoorbeeld niet op 80% wordt gesteld. Echter, ik vind het belangrijk bij proefdier experimenten, in het kader van verantwoord proefdiergebruik, om de kans op vals-negatieve bevinden te minimaliseren. Voorts wil ik graag opmerken dat in de Groningse opleiding tot artikel 9 gecertificeerde, de 90% grens wordt aangeraden (zie Handboek proefdierkunde, Van Zutphen/Baumans/Beynen, 4^e druk, hoofdstuk 12).

- De DEC-UM vraagt zich af hoe het vasten praktisch wordt uitgevoerd (er staat in de DEC overnacht vasten)? In de Universiteit Maastricht wordt ervoor gezorgd dat de dieren gedurende de eerste schemerperiode nog kunnen eten (of het voer 4 uur voor de aanvang van het experiment wegnemen of overnacht beperkt voeren of voer 's avonds laat wegnemen). Waarom wordt de controlegroep niet gevast?

Met overnacht vasten wordt het wegnemen van het vaste voedsel tussen 16 en 17 uur bedoeld. Wanneer het vaste voedsel wordt weggenomen worden ook losse brokken die in zich in de kooi bevinden weggenomen. De paracetamol injectie vindt vervolgens tussen 8 en 9 uur 's ochtends plaats. Het overnacht vasten is noodzakelijk voor reproduceerbare en voorspelbare paracetamol-geïnduceerde leverschade. Het vasten resulteert in depletie van glutathion in de lever. Glutathion beschermt tegen paracetamol-geïnduceerde leverschade en de grotere spreiding in schade in niet gevaste dieren is te wijten aan verschillen in de glutathion concentratie in de lever tussen verschillende muizen. De noodzaak voor vasten in dit type experimenten is uitgebreid beschreven in de literatuur. De reden om de controlegroep niet te vasten is dat er geen effect van het vasten op het experimentele eindpunt (snelheid van trombusvorming na FeCl₃ applicatie) verwacht wordt. Het vasten van de controlegroep zou dus onnodig ongerief opleveren en daarom is hier niet voor gekozen.

- Zijn alle personen die vermeld zijn uit Groningen art.9/12 bevoegd

zijn allen art 9 gecertificeerd, terwijl art 12 bevoegd is. Overigens zijn niet bij dit experiment betrokken, maar zijn ze genoemd in deze deelaanvraag omdat beiden wel betrokken zijn bij het basisproject wat gaat over de rol van het hemostatisch systeem in paracetamol-geïnduceerd leverfalen.

Ik hoop hiermee de vragen van de DEC voldoende te hebben beantwoord.

Hoogachtend,

UMC Groningen.

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
10-11-2011

Project: *Het effect van paracetamol-geïnduceerd acuut leverfalen op in vivo extrahepatische trombusvorming.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM**Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T (043):

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-145
Diersoort: muis
Aantal dieren: 33
Einddatum: 09-11-2015

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

Videovoorzitter DEC-UM