

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
	Nieuw		

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:

Efficientie van nucleïne-zuren afgifte in skeletspier mbv een lokaal ultrageluid activeerbaar systeem

startdatum Juni 2011

einddatum ⁹

Juni 2015

Duur van de proef¹⁰:

6 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. (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art.12	
5.				Art.9	
6.					
7.					
8.					
9.					

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	exp	ctrl					
Diersoort	mouse	mouse					
Stam	Balb/c	Balb/c					
Construct / mutatie?	-	-					
Herkomst (leverancier) *	02	02					
Aantal	140	80					
Geslacht	m/v	m/v					
Dieren immuuncompetent?	ja	ja					
Leeftijd/gewicht	6-10 wk	6-10 wk					
Doel van de proef *	33	33					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	04	04					
Mate ongerief *	04	04					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHI-codes

Verantwoording

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

Titel: Efficiëntie van nucleic acid afgifte in skeletspier mbv een lokaal ultrageluid activeerbaar systeem

1. Doel van de proef.

Gentherapie is het inbrengen, veranderen of verwijderen van specifieke genen in een individuele cel met als doel het corrigeren van een deficiëntie in het DNA of genoom van een patient. Gentherapie wordt gezien als een zeer specifieke behandeling met zeer lage toxiciteit

Als therapeutica voor gentherapie worden nucleïnezuuren gebruikt (bijv. stukjes DNA of RNA). Echter door de slechte opname van nucleïnezuuren in weefsel, richt dit onderzoek zich op het bevorderen van de opname van nucleïnezuuren door gebruik te maken van ultrageluid in combinatie met microbellen. Microbellen, welke klinisch gebruikt worden als contrastmiddel voor ultrageluid, worden acoustisch geactiveerd om de permeabiliteit van het endotheel te verhogen. Op deze manier kan lokaal de hoeveelheid van een therapeuticum in het weefsel worden verhoogd.

Doel van de proef: Het verbeteren van de opname van nucleïnezuuren in een spiercellen van een muis gebruikmakend van het verhoogde extravasatie effect van ultrageluid en microbellen.

De behandeling van de spier is gekozen als model voor toekomstig onderzoek in de richting van spierziekten (bijv. spierdystrofie). Ook kan de skeletspier dienen als model voor de behandeling van de hartspeer, welke technisch moeilijker te behandelen. Door deze ultrageluid behandeling wordt inzicht verkregen in de mate van correctie van deficiëntie in een cel na afgifte van nucleïnezuuren. Om dit doelen te bereiken zal er een vergelijking gemaakt worden tussen cellen behandeld met en zonder ultrageluid in combinatie met microbellen.

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

- 1) Evans blue en radioactief gelabeld albumine kwantificatie in spierweefsel (gebruikt voor lever opname in DEC 2010-065 experiment 5) voor het optimaliseren van de ultrasound settings in combinatie van microbellen.
- 2) Histologie voor kwantificatie van spierschade
- 3) Spierweefsel te analyseren met qPCR, hierbij wordt gekeken naar de knockdown of expressie van het therapeuticum.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Het huidige proefdierproject heeft ten doel om te kijken of nucleïnezuuren efficiënt kunnen worden afgegeven in spierweefsel van een muis als model voor skeletspier en hartspeer afgifte.

Volgens het VSN (Vereniging Spierziekten Nederland) hebben circa 100.000 mensen in Nederland een spierziekte. Deze ziekten zijn over het algemeen niet te genezen en verslechteren in tijd. Patienten kunnen eindigen in een rolstoel of kunnen voortijdig overlijden. Momenteel is er voor de meeste ziekten geen medicijn en bestaat behandeling vooral uit palliatieve zorg.

Volgens de Nederlandse hartstichting is bijna 1 miljoen Nederlanders hart- of vaatpatiënt en maar liefst 1 op de 3 Nederlanders sterft aan een hart- of vaatziekte. Het hart is een grote complexe spier. Naar schatting hebben zo'n 40.000 Nederlanders een vorm van hartspierziekten (cardiomyopathie). Cardiomyopathie is een chronische aandoening. Behandeling met medicijnen voorkomt verslechtering, maar geen genezing. Nieuwe behandelmethoden zijn dus gewenst.

Medicatie met doel tot genezing heeft een van de hoogste prioriteiten in de wereld van de spierziekten. Gentherapie kan hier een belangrijke rol spelen. Vanwege de wetenschappelijke

spierziekten. Genterapie kan hier een belangrijke rol spelen. Vanwege de wetenschappelijke ontwikkelingen op het gebied van spierziekten en hart model studies is er vraag naar wetenschappelijk onderzoek aan muismodellen als simulatie van humane spier- en hartziekten.

3. Alternatieven

Voor het aantonen van het effectief behandelen van de spier, als model voor de hartspier en voor spierziekten, met een afgifte systeem waarvan de werking berust op lokale afgifte na lokale of intraveneuze injectie is het essentieel te weten welk percentage van het therapeutikum zich ophoopt in de spier. 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. Perfusie van de organen, de reactie van het immuunsysteem en andere fysiologische effecten van de behandeling zullen naar verwachting een groot effect hebben op de uitkomst, zodat niet kan worden volstaan met *in vitro* metingen. Alleen een diermodel komt in aanmerking. Deze *in vivo* studie bouwt voort op de resultaten gevonden in de studie met DEC nummer 2010-065, waarbij voor andere organen en weefsel gekeken is naar de optimalisatie van ultrageluid settings, siRNA concentraties en kwantificatie van de RNA afgifte op cel niveau.

4. Ethische afweging

De niet-invasieve ultrageluid geïnduceerde afgifte wordt in deze studie gebruikt om nucleïnezuren af te geven in skeletspier, met als toekomstige applicatie het behandelen van spierziekten (bv. spierdystrofie). Daarnaast kan de skeletspier in de poot van de muis dienen als eenvoudig model voor de zeer complexe en moeilijk te bereiken hartspier, voor toekomstige behandeling van patiënten met een cardiomyopathie.

In Nederland hebben volgens de VSN (Vereniging Spierziekten Nederland) naar schatting 100.000 mensen een spierziekte. Er worden zo'n 600 spierziekten onderscheiden. Een van de bekendste spierziekte is spierdystrofie en verwijst naar een groep met meer dan 30 erfelijke ziekten die spierzwakte of -afbraak veroorzaken. Al deze ziekten hebben gemeen dat ze spieren verder verzwakken naarmate de ziekte vordert en het merendeel van de patiënten eindigt in een rolstoel. Momenteel zijn meeste spierziekten ongeneeselijk en bestaat behandeling uit onder andere orthopedische materialen, corrigerende chirurgie en bewegingstherapie. Aanwezige medicijnen hebben als doel vertraging en bestrijden van de symptomen.

Inzicht krijgen in mogelijke behandeling van het hartaandoeningen is zeer gewenst. In Nederland lijdt een groot aantal mensen aan hartkwalen, dat gepaard gaat met een significante afname van de kwaliteit van leven.

Aangezien genterapie een nieuwe vorm van therapie is in de behandeling van spierziekten, is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Gezien het hoge aantal patiënten dat gebaat is bij onderzoek naar effectievere behandelmethoden, weegt ons inziens de maatschappelijke relevantie op tegen het ongerief van het dier.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Microbellen worden klinisch gebruikt als ultrageluidcontrastmiddel voor het bepalen van de functie van de linkerhartkamer en voor het meten van de perfusie van het myocardium of lever. De perfusie van de lever wordt vooral gebruikt voor de detectie van tumoren. Een microbel bestaat uit een gasbelletje, maximaal ter grootte van een rode bloedcel en heeft een schil bestaande uit fosfolipiden 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 zoals, bijvoorbeeld het blokkeren van de aanmaak van specifieke eiwitten (in het geval van siRNA), zal afhangen van een groot aantal parameters: concentraties van microbellen, doses van het therapeutica en de ultrageluid-instellingen.

Eerder is aangetoond, dat ultrageluid behandeling van skeletspieren leidt tot een verhoging van extravasatie van de kleurstof Evans Blue. Ook is gebleken in DEC 2009-181 dat ultrageluid behandeling van tumoren (op de flank van de muis) leidt tot een sterk verhoogde extravasatie van Caelyx in de onderliggende spier. Het effect op spier is telkens sterker dan het effect op lever of tumor in de tot dusverre uitgevoerde experimenten. Echter, het effect van ultrageluid behandeling op afgifte van nucleïnezuren in spier is nog niet met verschillende microbellen bestudeerd en gekwantificeerd.

..... In een voorafgaande experimenten (DEC2008-088) is de bloedkinetiek en biodistributie van deze microbellen bestudeerd. Deze experimenten gaven aan dat de bellen lang genoeg circuleren om, in een muismodel, gedurende 5 minuten een ultrageluidbehandelingen uit te voeren op een tumor. In dit experiment zal de extravasatie van verschillende microbellen vergeleken worden om een goed overzicht te krijgen tussen commercieel verkrijgbare microbellen en zelfontwikkelde microbellen.

Aangezien grote hoeveelheden nucleïnezuren nodig kunnen zijn om een effect te verkrijgen, wordt er in deze studie dan ook de optie opengehouden om niet eenmaal een behandeling uit te voeren, maar te behandelen op drie opeenvolgende dagen. Om het ongerief van de dieren zoveel mogelijk te beperken, zal in experiment 1 gekeken worden naar de invloed van meervoudige behandeling ten opzichte van één enkele behandeling. Op basis van deze resultaten zal beslist worden over de wijze van experimenteren in de studie (experiment 2). Tevens zal in experiment 1 een optimalisatie plaatsvinden omtrent het gehele protocol. Evans Blue en/ of radioactief gelabeld albumine zullen hierbij gebruikt worden om de extravasatie te kwantificeren.

Experiment 1:

Experiment 1 is het optimalisatie-experiment, waarbij de ultrageluidsettings en protocollen zoals gevonden in DEC 2010-065 verder worden geoptimaliseerd voor skeletspierweefsel. De mate van extravasatie wordt bepaald via Evans Blue en radioactief gelabeld albumine. De gevonden optimale settings worden gebruikt voor experiment 2.

Experiment 2:

Kwantificatie van nucleïnezuren afgifte in skeletspier. Hierbij wordt gekeken naar welke doses of therapeutikum nodig is en of deze intraveneuze of lokale geïnjecteerd moet worden. Als leidraad dient de geoptimaliseerde ultrageluidtherapie zoals gevonden in experiment 1.

6. Wetenschappelijke beoordeling

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

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

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

$114 + 106 = 220$ muizen

De belangrijkste analyse methoden zijn visuele inspectie, meten van Evans Blue en radioactief albumine, en qPCR van het effect van het therapeutikum. Power berekeningen (Students t-test onafhankelijke metingen) zijn uitgevoerd voor de laatste twee methoden, met het programma We hebben gebruikt de Student's t-test met $\alpha = 0.05$ en Power = 0.8.

Evans Blue extractie en meten van radioactief gelabeld albumine:

In vorige experimenten is gevonden dat in behandelde spieren 4 tot 10 maal zoveel extravasatie te meten is dan in onbehandelde spieren, waarbij de variatie ongeveer 30% van de gemeten waarde is voor beide methoden. De behandelde en niet behandelde groepen zijn van gelijke grootte. Wanneer er 4 maal zoveel extravasatie wordt gevonden ten opzichte van de referentie 1, is het kleinste verschil $4 - 1 = 3$. Een variatie van 30% op 4 levert voor het kleinste verschil een SD van $0.3 \cdot 4 = 1$. Voor het software programma komt dit neer op een kleinste verschil van 3 met een SD van 1. 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 1. If the true difference in the experimental and control means is 3, we will need to study 3 experimental subjects and 3 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 3 moeten gebruiken voor Evans blue als ook voor radioactief gelabeld albumine.

qPCR:

In voorgaande experimenten was de gemeten mRNA concentratie van het target gen in behandeld weefsel meestal ongeveer 50% van de concentratie in onbehandeld weefsel, met een variatie in de metingen van 20%. De behandelde en onbehandelde groepen zijn meestal even groot. Voor het software programma komt dit neer op een kleinste verschil van 0.5 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 0.5, we will need to study 4 experimental subjects and 4 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 4 moeten gebruiken.

Experiment 1: optimalisatie van extravasatie in skeletspier

In dit experiment worden ultrageluidsettings geoptimaliseerd om een optimale afgifte van therapeuticum te verkrijgen in de skeletspier van een muis. De gevonden ultrageluidprotocollen en settings van DEC 2010-065 en DEC 2009-181 dienen hiervoor als leidraad (beide DEC aanvragen waar gefocust op lever en tumor). Verder zal er een vergelijking gemaakt worden tussen verschillen type microbellen om zo de optimale situatie te verkrijgen voor experiment 2.

Om de extravasatie te bestuderen worden er twee stoffen geïnjecteerd: de kleurstof Evans Blue en/of radioactief gelabeld albumine worden. Voor beide kunnen de concentraties in weefsel quantitatief bepaald worden. Echter het is niet bekend welke nu voor skeletspierweefsel de beste resultaten geven.

Er zal ook gekeken worden naar verschillende soorten ultrageluidcontrastmiddel,

Rekening houdend met het onderzoeken van de verschillende methodes voor het meten van de extravasatie (2), variaties in de mogelijke toedieningmethode in experiment 2 voor de nucleïnezuuren (lokaal, intraveneus), verschillende ultrageluidsettings (3) en de 3 verschillende microbellen, komt het benodigde aantal groepen op $2*2*3*3 = 36$. Bij een groepsgrootte van 3, zoals boven aangegeven, komt het aantal dieren op $36*3 = 108$. Rekening houdend met 5% uitval komt het aantal voor deze studie neer op maximaal $108/0.95 = 113.7 = 114$ muizen.

Experiment 1, totaal = 114

Indien het duidelijk is dat een van de extravasatie meetmethoden beter is dan de ander, zal alleen deze methode worden voortgezet om het aantal dieren te beperken.

Formulering	injectie	Ultrageluid settings	microbellen	ultrageluid
Evans Blue	lokaal	Setting 1	Type 1	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 2	Type 1	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 3	Type 1	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 1	Type 1	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 2	Type 1	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 3	Type 1	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 1	Type 2	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 2	Type 2	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 3	Type 2	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 1	Type 2	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 2	Type 2	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 3	Type 2	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 1	Type 3	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 2	Type 3	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 3	Type 3	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 1	Type 3	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 2	Type 3	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 3	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 1	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 2	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 3	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 1	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 2	Type 1	Ja

Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 3	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 1	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 2	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 3	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 1	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 2	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 3	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 1	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 2	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 3	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 1	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 2	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 3	Type 3	Ja

Experiment 2: kwantificatie van afgifte van nucleïnezuren in skeletspier

In dit experiment zal, m.b.v. de gevonden optimale ultrageluidtherapieprotocollen uit experiment 1 de nucleïnezuren afgifte in skeletspier worden gekwantificeerd. Hierin worden verschillende doses van het therapeuticum bestudeerd en een vergelijking gemaakt tussen verschillende microbellen. Voor dit experiment zal alleen de meetmethode qPCR gebruikt worden, waarvoor zoals boven is aangegeven, een groepsgrootte van 4 nodig is.

3 Verschillende concentraties therapeuticum worden er getest, met 2 verschillende type microbellen (de keuze wordt gebaseerd op resultaten van experiment 1). Dit zorgt er voor dat er $2 \times 3 = 6$ experimentengroepen zijn.

Voor elke experimentengroep zijn er de volgende controlegroepen:

- 1) Therapeuticum met microbellen maar zonder ultrageluid (geen activatie van de microbellen)
- 2) Niet-functioneel therapeuticum met microbellen en ultrageluid
- 3) Niet-functioneel therapeuticum met microbellen zonder ultrageluid (geen activatie van de microbellen)

Om de achtergrond te meten van de expressie van het therapeuticum is er een extra controlegroep nodig waarbij alleen fysiologisch zout wordt geïnjecteerd (zonder microbellen en zonder ultrageluid)

Onderstaande tabel toont een schematische weergave van de studiegroepen.

Studiegroep	Formulering	concentratie	microbellen	ultrageluid
controle	PBS	-	-	Nee
experiment	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Ja
controle	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Nee
experiment	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Ja
controle	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Nee

Vanwege anesthesie en behandeling verwachten we 5% uitval in experiment 2 in de experimentgroep en controlegroep.

Experimentgroepen:

$4 * 6 = 24$ dieren

Met 5% uitval $24/0,95 = 25,3 = 26$

Controlegroepen:

$$4 * 6 * 3 + 4 * 1 = 76 \text{ dieren}$$

$$\text{Met 5\% uitval } 76/0,95 = 80.0 = 80$$

Experiment 2, totaal = **106**

Dierproef

8. Experiment

Om een goede behandeling uit te voeren met ultrageluid moet de behandelende poot ontdaan worden van de vacht. Vervolgens wordt er een ultrasoundgel aangebracht op deze poot om een goede koppeling te krijgen voor de transmissie van de ultrageluidsgolven tussen transducer en behandeld gebied.

De intraveneuze injecties zullen plaatsvinden via de staartvene. De microbellen worden geïnjecteerd via een catheter in de staartvene. Om te testen welke toedieningsmethode de beste is worden Evans Blue, radioactief gelabeld albumine en de nucleïnezuuren in experiment 2 via de staartvene of door een lokale intramusculaire injectie. Per keer dat het dier onder anesthesie is, zal het totale injectie volume de 200 µl niet overstijgen.

Wanneer ervoor wordt gekozen om op drie aansluitende dagen de muis te behandelen dan zal het dier per dag maximaal 200µl geïnjecteerd krijgen en zullen ze niet langer dan één uur onder anesthesie zijn.

Om de afgifte te optimaliseren worden verschillende parameters en protocollen getest. Ultrageluid settings en protocollen zoals gevonden in DEC 2010-065 en DEC 2009-181 dienen hiervoor als leidraad.

Formulering	injectie	Ultrageluid settings	microbellen	ultrageluid
Evans Blue	lokaal	Setting 1	Type 1	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 2	Type 1	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 3	Type 1	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 1	Type 1	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 2	Type 1	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 3	Type 1	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 1	Type 2	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 2	Type 2	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 3	Type 2	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 1	Type 2	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 2	Type 2	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 3	Type 2	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 1	Type 3	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 2	Type 3	Ja
Evans Blue	lokaal	Setting 3	Type 3	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 1	Type 3	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 2	Type 3	Ja
Evans Blue	intraveneus	Setting 3	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 1	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 2	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 3	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 1	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 2	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 3	Type 1	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 1	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 2	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 3	Type 2	Ja

Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 1	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 2	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 3	Type 2	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 1	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 2	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	lokaal	Setting 3	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 1	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 2	Type 3	Ja
Rad. actief albumine	intraveneus	Setting 3	Type 3	Ja

Experiment 1a: optimalisatie van extravasatie in skeletspier (Evans Blue)

Behandelschema

0 <1uur max 24uur <1uur max 24uur <1uur max 72uur

 O U,I O U,I O U,I E

O: plaatselijk ontharen van de muis en opbrengen ultrasound gel

I: iv of lokale injectie Evans Blue. Bij lokale injectie kunnen de spieren van een of beide poten geïnjecteerd worden.

U: injectie microbellen en ultrageluid.

E: euthanasie

--- dier onder anesthesie

___ dier niet onder anesthesie

Experiment 1b: optimalisatie van extravasatie in skeletspier (radioactief gelabeld albumine)

Behandelschema

0 <1uur max 24uur <1uur max 24uur <4 uur max 72uur

 O U,I O U,I O U,I,S E

O: plaatselijk ontharen van de muis en opbrengen ultrasound gel

I: iv of lokale injectie radioactief gelabeld albumine. Bij lokale injectie kunnen de spieren van een of beide poten geïnjecteerd worden.

U: injectie microbellen en ultrageluid.

S: SPECT imaging

E: euthanasie

--- dier onder anesthesie

___ dier niet onder anesthesie

bij de laatste behandeling is de mogelijkheid opgenomen om een SPECT scan te maken van het radioactief gelabeld albumine. Deze SPECT scan zal worden uitgevoerd wanneer het dier nog onder anesthesie is. Maximaal 72 uur na het (laatste) experiment zullen de dieren onder anesthesie geeuthaniseerd worden. Na het experiment zullen weefsels worden genomen voor histologisch of ex vivo analyse van Evans Blue en radioactief gelabeld albumine.

Experiment 2: kwantificatie van afgifte van nucleïne-zuren in skeletspier

In dit experiment zal, m.b.v. de gevonden optimale parameters van experiment 1, de nucleïne-zuren afgifte in spier worden gekwantificeerd via qPCR.

Studiegroep	Formulering	concentratie	microbellen	ultrageluid
controle	PBS	-	-	Nee
experiment	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Ja
controle	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 1	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 1	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 1	Nee
experiment	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Ja
experiment	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Ja
controle	Functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Nee
controle	Functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Ja
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Laag	Type 2	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	Midden	Type 2	Nee
controle	Niet-functioneel therapeuticum	hoog	Type 2	Nee

Behandelschema

0 <1uur max 24uur <1uur max 24uur <1uur max 72uur

 O U,I (O) U,I (O) U,I E

O: plaatselijk ontharen van de muis en opbrengen ultrasound gel

I: iv of lokale injectie nucleïne-zuren. Bij lokale injectie kunnen de spieren van een of beide poten geïnjecteerd worden.

U: injectie microbellen en ultrageluid.

E: euthanasie

--- 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. Bij euthanasie via cervicale dislocatie wordt er altijd pijnbestrijding 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 spier mbv ultrageluid en microbellen onderzocht worden. Er wordt geen ernstige mate van ongerief verwacht. Deze verwachting is gebaseerd op resultaten en ervaringen van DEC 2009-125, waar reeds onderzocht is welke ultrageluid settings niet schadelijk zijn. Deze settings dienen als lijdraad voor deze aanvraag. Vanwege de behandeling van de spier met ultrageluid zal speciale aandacht worden geschonken aan plaatselijke bloedingen en/of motorische afwijkingen na behandeling. Onder ernstig ongerief wordt verstaan: ernstige bloedingen/ kneuzingen en ernstige belemmering van de motoriek zoals bv verlamming of mank lopen, 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 1a: optimalisatie van extravasatie in skeletspier (Evans Blue)

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	3	10 min	03
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene of lokale injectie van Evans Blue	3	15 min	03
Mogelijke toxisch effect van het Evans Blue	3	max. 1 week	03
Ultrageluid behandeling onder anesthesie, gevolgd door bijkomen dier	3	max. 1 hours	04
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	03
Total			04

Schatting van totale mate van ongerief: matig/ernstig (code 04)

Experiment 1b: optimalisatie van extravasatie in skeletspier (radioactief gelabeld albumine)

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	3	10 min	03
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene of lokale injectie van radioactief gelabeld albumine	3	15 min	03
Mogelijke toxisch effect van het radioactief gelabeld albumine	3	max. 1 week	03
Ultrageluid behandeling en mogelijk SPECT scan onder anesthesie, gevolgd door bijkomen dier	3	max. 4 hours	04
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	03
Total			04

Schatting van totale mate van ongerief: matig/ernstig (code 04)

Experiment 2: kwantificatie van afgifte van nucleïnezuuren in skeletspier

Procedure	herhaling	Duur	Ongerief code
Onder anesthesie brengen, ontharen en opbrengen ultrasound gel	3	10 min	03
Onder anesthesie cannulatie van de staart vene of lokale injectie van therapeuticum	3	15 min	03
Mogelijke therapeutisch/ toxisch effect van het therapeuticum	3	max. 1 week	03
Ultrageluid behandeling onder anesthesie, gevolgd door bijkomen dier	3	max. 1 hours	04
Euthanasie onder anesthesie	1	45 min	03
Total			04

Schatting van totale mate van ongerief: matig/ernstig (code 04)

10b. Welzijnsevaluatie

..... DEC 2010-065..... De mate van ongerief is nooit hoger geweest dan code 04. 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

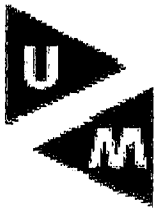
Ervaren artikel 12 functionarissen van de Universiteit Maastricht zullen het proefdierwerk uitvoeren. Zij zullen worden bijgestaan door de VO. Zij heeft ruime ervaring met biodistributie bepalingen en nucleaire beeldvorming bij dieren.

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, 31-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Efficiëntie van nucleïnezuren afgifte in skeletspier mbv een lokaal ultrageluid activeerbaar systeem*", is op de DEC vergadering van 27 mei 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen. (6 dg)
- Punt 7c- experiment 1- De DEC heeft zijn twijfels over de berekeningen. De DEC wenst een motivering voor de groepsgrootte. De DEC vraagt zich af waarom de extravasatie, zowel op basis van Evans Blue als met gelabeld Albumine dient te gebeuren, aangezien dit een verdubbeling van het benodigde aantal dieren met zich meebrengt.
- De DEC kan de berekening van de groepsgrootte niet volgen. Er wordt een variatie van 30% genoemd, maar met een SD van 1 gerekend, graag toelichten. Waar refereert het kleinste verschil van 3 aan?
- Punt 7c- experiment 2- De DEC verzoekt alle groepen te benoemen met de overeenkomstige controlegroepen. Waarschijnlijk kan de derde controle groep slechts éénmaal uitgevoerd worden, zo niet dan gaarne de motivatie hiervoor.
- De DEC zou gaarne bij punt 8 een schematische weergave van de experimentele en controle groepen vermeldt zien.
- Bij punt 10a, bij experiment 1a en 1b verzoekt de DEC het woord "therapeutisch" te verwijderen.

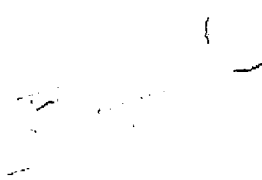
Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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 2011-075, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,



Voorzitter DEC-UM

Aan: voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon

Uw referentie: DEC2011-075

Eindhoven, 16-06-2011

Geachte DEC,

Bij deze de respons op wijzigingsbrief project DEC 2011-075 (uw referentie MQ- 294-11):

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen. (6 dg)

Dit hebben we aangepast op het voorblad.

- Punt 7c- experiment 1- De DEC heeft zijn twijfels over de berekeningen. De DEC wenst een motivering voor de groepsgrootte. De DEC vraagt zich af waarom de extravasatie, zowel op basis van Evans Blue als met gelabeld Albumine dient te gebeuren, aangezien dit een verdubbeling van het benodigde aantal dieren met zich meebrengt.

De constatering van de DEC dat er een verdubbeling optreedt van het aantal dieren voor dit experiment, is correct. Echter na het aanhouden van de DEC aanvragen 2011-052 en 2010-193 en de persoonlijke gesprekken met de voorzitter is naar voren gekomen dat de DEC het niet dult dat er een variatie aanwezig mag zijn in de experiment beschrijving. En er is expliciet aangegeven dat er voor iedere variatie een aparte diergroep gedefinieerd dient te worden. Tijdens een discussie met de voorzitter hebben we aangegeven dat we dit een ongewenste situatie vinden, omdat dit inhoudt dat het aantal dieren binnen, voor ons, één experiment toeneemt en dat niet alle dieren in experiment gaan. Het andere uiterste zou zijn dat we echter meer één readout definiëren, maar dan leidt dit tot onnodig veel tijd verlies en extra veel dieren. Het laatste vanwege het feit dat de gekozen methode misschien niet voldoet en herhaald moet worden om verder te kunnen gaan met de volgende experimenten.

Om toch ons een beperking op te leggen en aan te geven dat we beide experimenten niet volledig gaan uitvoeren is er de zin: "Indien het duidelijk is dat een van de extravasatie meetmethoden beter is dan de ander, zal alleen deze methode worden voortgezet om het aantal dieren te beperken", aan toegevoegd.

De vraag waarom we twee methode opvoeren voor het meten van de extravasatie is, dat we niet zeker zijn of een van de methoden wel een goed weergaven geeft van de

extravasatie. Dit heeft vooral te maken met het feit dat beide moleculen (Evans Blue en gelabeld Albumine) ieder een eigen farmacokinetiek hebben zowel in het bloed als intracellulair. Uit resultaten van eerdere experimenten is naar voren gekomen dat ieder weefsel zijn eigen methode vraagt.

- De DEC kan de berekening van de groepsgrootte niet volgen. Er wordt een variatie van 30% genoemd, maar met een SD van 1 gerekend, graag toelichten. Waar refereert het kleinste verschil van 3 aan?

Er is een verduidelijking aangebracht in de tekst: "Wanneer er 4 maal zoveel extravasatie wordt gevonden ten opzichte van de referentie 1, is het kleinste verschil $4-1 = 3$. Een variatie van 30% op 4 levert voor het kleinste verschil een SD van $0.3 \cdot 4 = 1$."

- Punt 7c- experiment 2- De DEC verzoekt alle groepen te benoemen met de overeenkomstige controlegroepen. Waarschijnlijk kan de derde controle groep slechts éénmaal uitgevoerd worden, zo niet dan gaarne de motivatie hiervoor.

De derde controle groep is tweemaal nodig, vanwege het feit dat er twee ultrasound microbellen formuleringen getest worden. Om dit te verduidelijken is er een tabel toegevoegd om een beter inzicht te krijgen in de verschillende groepen en te laten zien dat er geen dubbele metingen uitgevoerd worden.

- De DEC zou gaarne bij punt 8 een schematische weergave van de experimentele en controle groepen vermeldt zien.

Tabellen toegevoegd aan de experiment beschrijvingen van punt 8.

- Bij punt 10a, bij experiment 1a en 1b verzoekt de DEC het woord "therapeutisch" te verwijderen.

Het woord "therapeutisch" is verwijderd.

De aangepaste versie van protocol 2011-075 is toegevoegd (aanpassingen zijn in grijs gemarkeerd).

Hopende uw vragen hiermee voldoende te hebben beantwoord voor goedkeuring,

Iov

Aan: _____

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht

18-07-2011

Project: *Efficiëntie van nucleïne-zuren afgifte in skeletspier mbv een lokaal ultrageluid activeerbaar systeem.*

DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

T

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, 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: 2011-075

Diersoort: muis

Aantal dieren: 220

Einddatum: 15-07-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM