



Niet-technische samenvatting 2016594

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Een veilig en effectief middel om trombose te remmen bij leverziekte.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Bloedstolling, leverziekte, trombose, antistolling

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Trombose is een veelvoorkomende ziekte van de bloedvaten die ernstige gevolgen kan hebben voor de patiënt. In slagaderen kan trombose leiden tot een hart- of herseninfarct, en in aderen tot een trombosebeen of longembolie. Deze aandoeningen hebben een aanzienlijk ziekte- en sterftecijfer. De behandeling van trombose bestaat uit het geven van antistollingsmiddelen ('bloedverdunners').</p> <p>Behandeling en het voorkomen van trombose is vaak nodig in patiënten met een leverziekte. Omdat de meeste bloedstollingsfactoren in de lever worden gemaakt, is antistollingsbehandeling bij deze patiënten lastiger. Het is echter om verschillende redenen goed om ook deze patiënten toch te behandelen met antistollingsmiddelen, met name voor het remmen van de voortgang van de leverziekte en voor het remmen van poortadertrombose, een specifieke vorm van trombose in de lever</p> <p>Chronische leverziekte kan leiden tot leverfibrose (vorming van littekenweefsel) en uiteindelijk tot cirrose. Cirrose is tot nu toe niet te genezen, de aangerichte schade is in dit eindstadium onherstelbaar. Als een te groot deel van de lever beschadigd is, is een levertransplantatie de enige overgebleven mogelijkheid. Dit is echter een ingrijpende operatie, met grote kans op complicaties. Daarnaast zijn er lange wachtlijsten. Het is dus van groot belang om het proces van cirrose tot stilstand te brengen.</p>
---	--

Een veelvoorkomende complicatie van chronisch leverfalen en cirrose is het ontstaan van trombose in de poortader naar de lever (PVT), iets dat lijkt toe te nemen met de ernst van de ziekte, tot zelfs 25% bij patiënten die in afwachting zijn op een levertransplantatie. Er zijn steeds meer aanwijzingen dat PVT een negatieve invloed kan hebben op de uitkomst van een levertransplantatie. Patiënten met een PVT op het moment van de transplantatie hebben een hoger risico op een tweede PVT na transplantatie.

Onderzoek bij proefdieren en bij mensen heeft laten zien dat antistollingsmiddelen gunstig zijn voor het vertragen van het ziekteproces wat leidt tot cirrose. Het voorkomen van stolling (met name in de lever) lijkt een innovatieve therapeutische strategie te zijn voor het behandelen van zowel cirrose als trombose.

Hoewel antistollingsmiddelen veelbelovende resultaten laten zien, is het bloedingsrisico een belangrijk nadeel, in het bijzonder in patiënten met een verminderde leverfunctie. Dierexperimenteel onderzoek laat echter zien dat het mogelijk is trombose te remmen zonder dat een bloedingsrisico optreedt.

Hoewel nog grote klinische studies nodig zijn, heeft het effect van antistollingsmiddelen op de voortgang van de ziekte de potentie om een revolutie te ontketenen in de klinische behandeling van patiënten met cirrose. Er is een directe noodzaak om een antistollingsmiddel te ontwikkelen dat veilig en effectief is in patiënten met een leverziekte.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Ons doel is om de optimale antistollingsbehandeling te vinden die zowel effectief als veilig is in het remmen van trombose en de voortgang van de leverziekte. Voor dit project hebben wij drie onderzoeksdoelen:

1. Effectiviteit van nieuwe antistollingsmiddelen/strategieën in vergelijking met bestaande middelen in het remmen van trombose in de lever (intrahepatische stolling);
2. Effectiviteit van nieuwe antistollingsmiddelen/strategieën in vergelijking met bestaande middelen in het remmen van trombose in andere delen van het lichaam (systemische stolling);
3. Veiligheid van nieuwe antistollingsmiddelen/strategieën in vergelijking met bestaande middelen bij leverziekte.

Door dit onderzoek verwachten wij een bijdrage te kunnen leveren in de zoektocht naar de optimale behandeling van zowel trombose als de ziekteprogressie in patiënten met een (chronische) leverziekte.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

De experimenten worden uitgevoerd in muizen.

Voor dit project zullen drie grote dierproeven uitgevoerd worden. Aantallen zijn afgerond op honderdtallen. Het totale aantal dieren wordt geschat op: 2370 voor onderzoeksdoel 1 (effectiviteit remmen intrahepatische stolling), 4480 voor onderzoeksdoel 2 (effectiviteit remmen systemische stolling) 640 voor onderzoeksdoel 3 (veiligheid).

Totaal aantal muizen voor de gehele aanvraag wordt daarom geschat op afgerond 7490.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Een deel van de muizen zal zes weken lang driemaal per week worden geïnjecteerd via het buikvlies met een middel dat leverschade veroorzaakt (tetrachloormethaan). Deze herhaalde injecties worden goed verdragen. In eerder uitgevoerde experimenten werden geen bijwerkingen gezien (zoals lokale irritatie, gedragsveranderingen of waarneembare klinische veranderingen).

In het model voor acuut leverfalen zullen de muizen na een nacht vasten geïnjecteerd worden met paracetamol. Ze mogen echter wel drinken en na de injectie mogen zij weer eten. Na de injectie zullen deze muizen zich enkele uren wat versuft voelen en minder actief zijn.

De modellen voor leverziekte geven zoals gezegd geen klinische symptomen en daarom verwachten wij niet dat er andere vormen van welzijnsaantasting zijn. We verwachten geen negatieve gevolgen voor het welzijn van de muizen als gevolg van een antistollingsbehandeling.

De muizen zullen onder algehele narcose zijn als de bloedingstest wordt uitgevoerd en als trombose wordt opgewekt met de modellen voor acute trombose (arteriële trombose, poortadertrombose en longembolie). De verwachte negatieve gevolgen zullen daarom gering zijn.

In het model voor spontane veneuze trombose kan het welzijn worden aangetast. In een pilot experiment (uitgevoerd in een eerdere aanvraag ingediend bij de CCD, aanvraag AVD105002016538), onderzoeken wij of het mogelijk is om dit model te verfijnen, waardoor het welzijn van de muizen uiteindelijk minder zal worden aangetast. Er zal bij dit trombosemodel tijdens de twee dagen na injectie pijnstilling gegeven worden om het ongerief te verminderen.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Remmen intrahepatische trombose

Voor het ontwikkelen van leverschade krijgen de muizen een dieet of injecties via de buikholte. Uit eigen ervaring en de literatuur blijkt dat klinische symptomen afwezig zijn ondanks forse histologische en biochemische schade aan de levers.

Het ongerief dat de muizen ondervinden bij leverschade schatten wij voor de diëten op licht (categorie 2).

Het ongerief dat zal ontstaan voor muizen die zes weken driemaal per week geïnjecteerd worden schatten wij op matig (categorie 3).

Remmen trombose en staartbloeding

Voor het opwekken van de acute trombose (arteriële trombose, poortadertrombose en longembolie) en het uitvoeren van de staartbloeding zullen de muizen onder narcose worden gebracht. Zij zullen hier niet meer uit ontwaken.

Het ongerief dat de controlemuizen (waarbij geen leverschade wordt opgewekt) ondervinden, schatten wij daarom op minimaal (categorie 1).

Het ongerief dat de muizen ondervinden die wel leverschade ontwikkelen schatten wij voor de diëten op licht (categorie 2) en voor de herhaaldelijke injecties op matig (categorie 3).

Het zwaarste ongerief zal ontstaan voor muizen waarbij het spontane trombose model wordt opgewekt d.m.v. injectie met siRNA's (small interfering RNA, wordt gebruikt om bepaalde genen uit te schakelen). Muizen zullen na injectie met siRNA worden behandeld met pijnstilling gedurende het experiment. Door de klinische symptomen die de muizen kunnen ontwikkelen bij dit trombose model schatten we dit ongerief op matig (categorie 3).

Onze verwachting is dat het ongerief bij muizen die behandeld worden met een antistollingsmiddel lager zal uitvallen.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Voor de analyse van de ontwikkeling van de leverziekte is het noodzakelijk dat de lever wordt uitgenomen. De muizen zullen dus als onderdeel van het

experiment gedood worden. Dit zal gebeuren onder anesthesie zodat de dieren geen pijn lijden.

Nadat trombose is opgewekt zal er een stolsel gevormd worden. Om deze stolsels te kunnen analyseren zullen organen en bloedvaten verwijderd moeten worden. De muizen zullen dus als onderdeel van het experiment gedood worden.

In een apart experiment zullen wij ook de staartbloeding uitvoeren. Om alle stollingstesten te kunnen uitvoeren hebben wij relatief veel bloed nodig. Deze muizen zullen als onderdeel van het experiment gedood worden, zodat genoeg bloed kan worden afgenomen. Dit zal gebeuren onder anesthesie zodat de dieren geen pijn lijden.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Tot nu toe zijn wij niet in staat om het ontstaan en de voortgang van chronisch leverfalen in het laboratorium goed na te bootsen. Daarom zijn wij genoodzaakt om dit te bestuderen met behulp van een proefdiervrij model. Dat geldt ook voor het complexe samenspel tussen bloedstollingsfactoren, vaatwand, stroming van het bloedvat e.d. in het ontstaan van trombose.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Modellen:

Het vasten voordat de paracetamol injectie gegeven wordt, zorgt voor minder spreiding van leverschade tussen verschillende dieren en verschillende experimenten. Hierdoor zijn minder dieren nodig.

Bloedingstesten kunnen een vrij grote spreiding binnen een groep hebben. In het verleden werd alleen de tijd die nodig was om het bloeden te stoppen gemeten en niet de hoeveelheid bloedverlies. In vergelijking met alleen een tijdmeting, geeft de methode die wij toepassen een verbeterde nauwkeurigheid, maar is toch eenvoudig uit te voeren zonder speciale apparatuur. Door de verbeterde nauwkeurigheid zijn minder muizen nodig per groep. Er is helaas geen alternatief, de staartbloeding is de enige beschikbare in vivo bloedingstest.

Statistische berekening en variatie:

Voor ieder experiment zal een statistische berekening worden gedaan om te bepalen hoeveel muizen er nodig zijn. Meer muizen zullen niet worden gebruikt. De groepen worden verder zoveel mogelijk gelijk gehouden met betrekking tot de leeftijd, geslacht, genetische achtergrond etc. om de variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren te beperken.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diervrij model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het

Er zijn verschillende trombosemodellen in muizen, die de situatie bij mensen goed nabootsen. Daarnaast zijn er voor de muis technieken beschikbaar waarbij de vorming van een stolsel in real-time gevolgd kan worden. De muis is daarom uitermate geschikt om de biologische processen betrokken bij trombose, die ook plaatsvinden bij de mens, in een compleet organisme te bestuderen. Bovendien zijn er voor muizen voor onze specifieke onderzoeksvragen veel meer laboratoriumtechnieken beschikbaar

project.

dan voor bijvoorbeeld ratten.

Muizen worden na het injecteren van siRNA vrij ziek. Om dit model te verfijnen zullen wij daarom eerst testen of lagere concentraties van de siRNA's gebruikt kunnen worden en of de duur van het experiment verkort kan worden. Dit experiment is onderdeel van een eerdere aanvraag ingediend bij de CCD (aanvraag AVD105002016538).

Het meest gebruikte muismodel voor longembolie omvat toediening van een dodelijke dosis van een stollingsmiddel aan een muis die bij bewustzijn is. Dat veroorzaakt een massale longembolie met als gevolg verlamming of dood binnen 15 minuten. Deze procedure is ingedeeld als ernstig ongerief (categorie 4). De verfijning bij dit model ontstaat doordat wij het hele proces uitvoeren onder algemene verdoving waardoor pijnlijke procedures worden vermeden. Het volgen van stolselvorming in de longen zal gebeuren terwijl de muis onder terminale verdoving is, waarna een niet-dodelijke dosis van het stollingsmiddel wordt toegediend. Dit is een belangrijke verfijning die verlamming en dood voorkomt.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Muizen zullen verder samen in een kooi gezet worden met kooiverrijking. Mocht het noodzakelijk zijn om muizen apart te houden (bijvoorbeeld als ze vechten), dan zullen muizen tijdelijk individueel gehuisvest worden. De muizen worden dagelijks gecontroleerd op welzijn zodat onverwachte ziekten en pijn tijdig op te sporen zijn en er adequaat op gereageerd kan worden. De experimenten worden uitgevoerd door bevoegd en competent personeel om het ongerief zo beperkt mogelijk te houden. De muizen zullen dagelijks gecontroleerd worden op welzijn zodat onverwachte ziekten en pijn tijdig op te sporen zijn en er adequaat op gereageerd kan worden. Mochten de symptomen ernstiger zijn dan verwacht, zullen de dieren gelijk uit het experiment genomen worden.

Verder vinden de experimenten waarbij trombose wordt opgewekt (behalve het siRNA model) plaats terwijl de muizen onder complete verdoving zijn. Onder verdoving worden verschillende testcomponenten (remmers van factoren, antistoffen, fluorescente probes, antistolling, etc) toegediend opgelost in fysiologische buffer. Het maximale volume wat de muizen ingespoten krijgen is 100 microliter.

Muizen die geïnjecteerd worden met siRNA worden behandeld met pijnstilling gedurende het experiment zodat zij geen onnodig ongerief zullen ondergaan.

Terminatie van de muizen zal plaatsvinden onder anesthesie zodat dieren geen pijn lijden. Arteriële trombose, poortadertrombose, longembolie en de staartbloeding zullen worden opgewekt onder een narcose waaruit zij niet meer ontwaken. Hierdoor ondervinden de muizen geen pijn of angst tijdens de handelingen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

17-08-2016

Beoordeling achteraf

Nee

Andere opmerkingen

Neer
