

Draadloos meten voor een beter dierenwelzijn

ECG, hartslag en acceleratie in het minivarken

**Didima de Groot¹, Roderick Slieker¹, PASCALLE van Loo¹,
Elwin Verheij¹, Helle Lorentsen², Fabien Masse³, Frank Bouwens³**

¹TNO, (www.tno.nl), Utrechtseweg 48, 3704 HE, Zeist, didima.degroot@tno.nl, ²Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, (www.minipigs.dk), Dalmose, Denmark, hl@minipigs.dk, ³Holst Centre/imec, (www.holstcentre.com), High Tech Campus 31, 5656 AE, Eindhoven, frank.bouwens@imec-nl.nl

Inleiding

Recent is door onderzoekers van het imec/Holst Centre een zogenoemd Wireless Body Area Network (WBAN) ontwikkeld. Dit is een netwerk van sensoren dat vitale lichaamsparameters aan de mens meet en deze draadloos naar een computer verstuurt. Voorbeelden hiervan zijn elektrocardiogram (ECG), elektromyogram (EMG), elektro-encefalogram (EEG), huid geleiding, huid temperatuur, etc. (1). Tot nog toe werden deze WBAN's alleen gebruikt om bij de mens verschillende parameters te monitoren, bijvoorbeeld voor ambulante zorg. De WBAN-technologie zou ook gebruikt kunnen worden bij dieren om hun biomedische gegevens te monitoren. Door de mogelijkheid van longitudinaal en simultaan meten van meerdere parameters van een dier zou bovendien een bijdrage kunnen leveren aan de vermindering en verfijning van het proefdiergebruik in het (regulatief) biomedische onderzoek. Vanuit de maatschappij is er toenemende aandacht voor 'vermindering, verfijning en vervanging' van proefdieren (3 V's) in het biomedisch onderzoek. De discussie voor 'proefdiervermindering' kent echter tegenstellingen: enerzijds bestaat behoefte aan een vermindering van het aantal gebruikte proefdieren en anderzijds ligt er zware druk op de farmaceutische industrie om de veiligheid van nieuwe geneesmiddelen zeker te stellen in – bij wet verplichte – dierstudies. Autoriteiten, industrie en regulerende instanties zoeken nu naar betrouwbare alternatieven die zouden kunnen leiden tot gereduceerd diergebruik in het verplichte veiligheidsonderzoek.

Het gebruik van dieren voor het aantonen van eventuele bijwerkingen is bij wet verplicht voor nieuwe geneesmiddelen, chemicaliën en stoffen die aan voedingsmiddelen worden toegevoegd. Het gebruik van ratten voor deze studies is vanuit historisch perspectief begrijpelijk. Echter, het gebruik van knaagdieren als model voor de mens blijkt niet altijd toereikend. Daarom is het gebruik van een niet-knaagdier zoals de hond of een non-humane primate verplicht gesteld bij veiligheidsevaluaties van nieuwe geneesmiddelen. Recent is een derde diersoort toegevoegd, namelijk het minivarken. Het minivarken lijkt een veelbelovend model voor veiligheidsonderzoek te zijn – beter dan hond – gezien de grote overeenkomsten met de mens in anatomie, biochemie en genetische eigenschappen. Daarnaast is er veel bekend over het varken met betrekking tot ziekten en immunologie (2). Er blijkt vooral veel overkomst te bestaan tussen het cardiovasculaire systeem van het minivarken en dat van de mens (3). Het minivarken past dan ook goed binnen het 3V-kader. Meer betrouwbare resultaten en betere translatie zouden in de toekomst kunnen leiden tot een vermindering van diergebruik in het (bij wet verplichte) biomedische onderzoek.

Het gebruik van de sensoren van imec/Holst Centre in combinatie met het minivarken zou een

aanzienlijke bijdrage kunnen leveren aan de verfijning en vermindering van het proefdieronderzoek. Dit, omdat het simultaan en herhaald meten van de functie van de drie belangrijkste orgaansystemen (cardiovasculaire systeem, respiratoire systeem en het centrale zenuwstelsel) op een diervriendelijke manier betere resultaten oplevert en bovendien de statistische kracht van dergelijke studies sterk vergroot.

Door TNO werd in samenwerking met Holst Centre, een studie uitgevoerd in het minivarken met de Holst Centre Wireless ECG-Necklace (4) waarin werd gekeken naar de toepasbaarheid van een niet-invasieve en draadloze sensor die het ECG, de hartslag en de acceleratie (d.w.z. versnelling van beweging) over de drie assen (X, Y, Z) meet. De acceleratie zegt iets over de activiteit die het dier op een gegeven moment heeft. In de studie werden vooral de acceptatie van de sensor, de kwaliteit en onderlinge relatie en integratie van de signalen -hartslag, ECG en activiteit- in ogenschouw genomen.

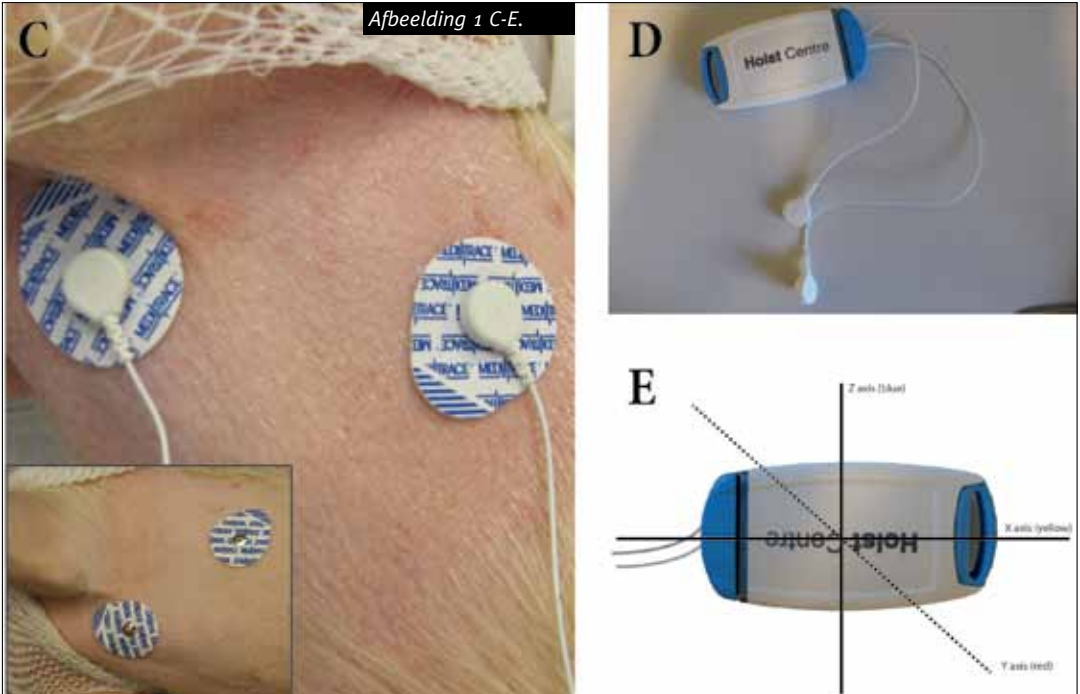
Methoden

Principe van de ECG-Necklace en de toepassing bij het minivarken (Afbeldingen 1 A-E)

De ECG-Necklace (4) is ontworpen om fysiologische karakteristieken van het hart bij de mens langdurig te monitoren zonder beperking van de bewegingsvrijheid. De necklace is eenvoudig in gebruik en het zeer lage energieverbruik garandeert een autonome, operationele levensduur van zeven dagen. Deze lange levensduur is mogelijk dankzij imec's innovatief en energie-efficiënt platform dat ondanks zijn klein formaat een lange levensduur kan garanderen. Software in de ECG-Necklace filtert en bewerkt het gedigitaliseerde ECG-signaal voor een nauwkeurige analyse van de hartslag, zelfs in aanwezigheid van hoge ruis. Hartsignaal en -ritme worden via een draadloze verbinding naar een computer verzonden binnen een straal van tien meter. Het is ook mogelijk om het ECG-signaal op een micro-SD kaart op te slaan voor latere analyse. Deze opstelling – inclusief de micro-SD kaart – werd ook in de hier beschreven haalbaarheidsstudie gebruikt.



Afbeelding 1 C-E.



Afbeelding 1. Minivarken (man; leeftijd: 5-6 maanden; lichaamsgewicht: 11,1 kg). Afb. 1A, 1B: De Holst Centre ECG necklace werd verzekerd in een elastische band die rond de buik van het minivarken was bevestigd met klittenband. De oriëntatie van de ECG-necklace werd opgeschreven om later de veranderingen in acceleratie te kunnen vertalen, aangezien acceleratie simultaan met het ECG werd gemeten. Afb. 1A: is bewerkt met Photoshop om de oriëntatie van de sensor te kunnen laten zien. Afb. 1C: bevestiging van de sensordraden aan de Meditrace ECG elektroden (zie inzet foto). Deze elektroden worden bevestigd aan de geschoren en schoongemaakte huid van het minivarken. Afb. 1D: foto van de Holst Centre sensor. Afb. 1E: de Holst Centre sensor met de oriëntatie van de verschillende assen ten opzichte van het dier. (Vergelijk Afb. 1A).

In deze studie werd een minivarken van zes maanden oud met een lichaamsgewicht van 11,1 kg gebruikt. Om de sensor te kunnen bevestigen werd de huid rondom de linker voorpoot en de hartregio geschoren en schoongemaakt. Onder en naast het hart werden twee elektroden geplakt. Aan deze elektroden werd de sensor met ‘drukknopen’ bevestigd. De sensor zelf bleek voldoende verzekerd te zijn in een elastische band die – sluitend met klittenband – om het middel van het minivarken sloot. Om het blijven haken achter voorwerpen te voorkomen werd een eenvoudig verbandgaas om het dier geschoven. Om vrij rond te kunnen lopen werden twee gaten gemaakt ten behoeve van de voorpoten.

De uitgangspositie (X, Y, Z-richtingen) van de sensor op het lichaam van het minivarken werd genoteerd om later de acceleratie (uitgedrukt in zgn. g-waarden ($[g = \text{valversnelling} = 9,81 \text{ m/s}^2]$) in de XYZ-assen te kunnen ‘vertalen’ in combinatie met het ECG (uitgedrukt in microVolts $[\mu V]$). In totaal is in drie sessies van 30-45 min gemeten en werd tussentijds de opgeslagen data gecontroleerd op correctheid van data-acquisitie en locale opslag. De totale tijd gedurende welke de sensor op het minivarken was bevestigd bedroeg ongeveer vier uur. Opvallende veranderingen in ruimtelijke oriëntatie van het dier – spontaan dan wel opgeroepen – zoals respectievelijk het ronddraaien van het dier om eigen as, of het optillen van het dier, werden genoteerd, alsmede de reactie van het dier. Tijdens analyse van de data is naar de integratie van de simultane metingen – hartslag (uitgedrukt in bpm [beats per minute]), ECG [microVolts μV] en activiteit (gedrag) – en bijbehorend dierenwelzijn – hoe ondergaat het dier het dragen van de necklace – gekeken. Tijdens de metingen werd het dier geobserveerd door drie observatoren en

werd speciaal gelet op acceptatie van de sensor en bijkomende gedragingen als rust en gemak van rondscharrelen, voedsel tot zich nemen en omgaan met toenadering van observatoren. Onder de observatoren bevond zich ook de dierenarts die dagelijks met minivarkens omgaat.

Resultaten

Evaluatie acceptatie van de sensor (Afbeldingen 2 A-B, pagina 34)

Het dier accepteerde de band met sensor goed. Ook het verbandgaas leek het minivarken op geen enkele wijze in de gedragingen te beperken; het dier bewoog zich vrij en scharrelde onverstoorbaar rond in de observatieruimte.

Evaluatie van de signalen

De ECG- en de XYZ-acceleratiesignalen bleken van goede kwaliteit. Wanneer het minivarken van oriëntatie veranderde was dit waar te nemen in een wisseling van de X- en de Y-as in acceleratiewaarden uitgedrukt in zgn. g-waarden. Bovendien bleek dat er overeenkomsten waren in de veranderingen in de XYZ-acceleratie en de hartslagfrequentie – bij een verandering van het gedrag van het minivarken. De signalen van ECG, HR, de XYZ-acceleratiesignalen en het gedrag van het dier bleken geïntegreerd te zijn; d.w.z. wijziging in het signaal van de ene parameter is zichtbaar in een wijziging in het signaal van een andere parameter.

Discussie

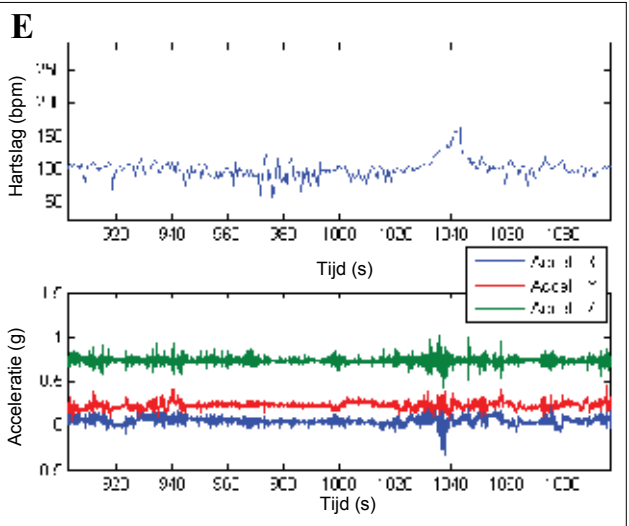
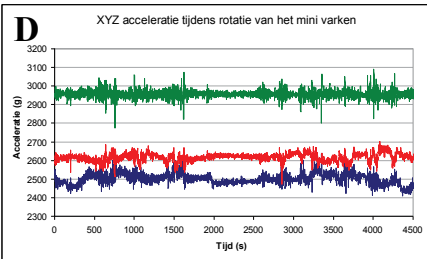
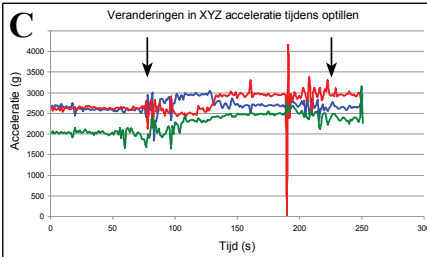
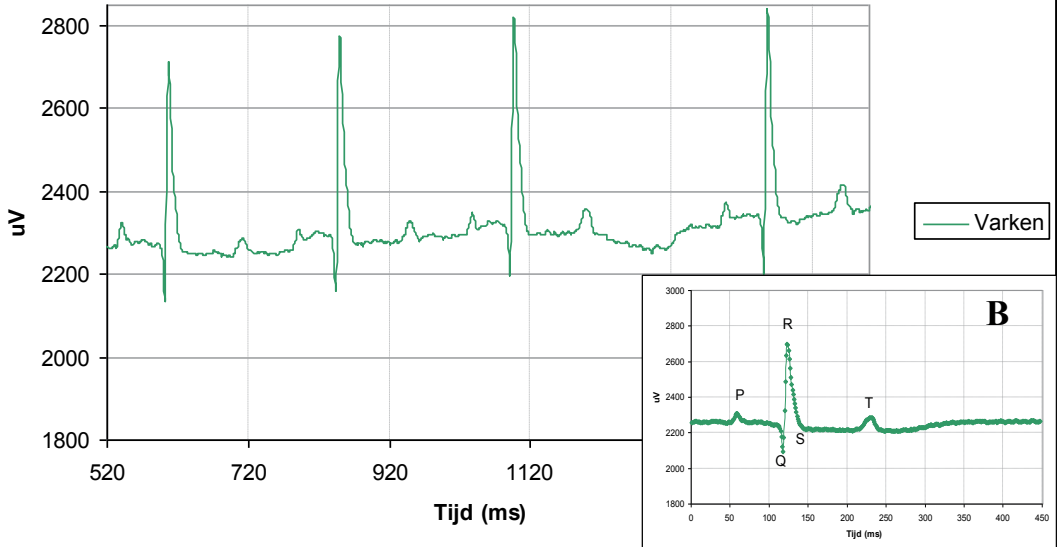
Het gebruik van de Holst Centre draadloze sensortechnologie in het minivarken zou een aanzienlijke bijdrage kunnen leveren aan het 3V-principe, namelijk vermindering en verfijning. Het minivarken accepteerde volkomen de ECG-sensor (verfijning). Het maakte, gedurende de gehele periode van circa 4 uur dat de sensor werd gedragen, op geen enkele wijze aanstalten om van de sensor, band of verband af te komen. Daarnaast waren de signalen van het ECG en de acceleratie van goede kwaliteit en konden eenvoudig worden geanalyseerd. Het continu en simultaan meten van diverse (vitale) parameters van een minivarken liggen binnen handbereik. Met deze technologie kan meer informatie worden verkregen van de dieren en zijn minder dieren nodig om eenzelfde hoeveelheid informatie te verkrijgen (vermindering). Opgemerkt moet worden dat het hier een haalbaarheidstudie betrof en het wenselijk is dat de studie herhaald wordt met meerdere dieren en gekeken wordt hoe het onderscheidend vermogen zal zijn wanneer dieren al dan niet een bepaalde behandeling ondergaan. Vooralsnog echter zijn de resultaten van de hier beschreven haalbaarheidsstudie veelbelovend.

Conclusie

Binnen het veiligheidsonderzoek van nieuwe geneesmiddelen, voedingsingrediënten en chemicaliën is het gebruik van proefdieren vooralsnog bij wet verplicht. Het gebruik van proefdieren kan wellicht nog verder worden geoptimaliseerd en de onderzoeken kunnen wellicht nog diervriendelijker uitgevoerd. De toepassing van Holst Centre's draadloze sensortechnologie in het minivarken als nieuw model voor veiligheidsonderzoek kan hier een bijdrage aan leveren. Aangevoerd werd dat het draadloze systeem – dat licht en klein van formaat is – door het minivarken zonder enige problemen werd geaccepteerd. Geconcludeerd werd daarom dat het systeem, althans onder de omstandigheden van onze studie, als diervriendelijk beschouwd kan worden. Het gebruik van een systeem dat herhaald, simultaan – en over een langere periode – metingen kan verrichten aan het cardiovasculaire systeem en daarmee gepaard gaande gedragingen, blijkt hier betrouwbare resultaten op te leveren; *a priori* kan gesteld worden dat simultaan en herhaald meten binnen eenzelfde individu relatief meer informatie oplevert en men derhalve met minder dieren zal kunnen volstaan om tot eenzelfde resultaat te komen waar het gaat om statistische betrouwbaarheid. Uitbreiding met (reeds bestaande) sensoren voor simultane metingen aan het respiratoire systeem en het centrale zenuwstelsel wordt onderzocht. »

A

ECG van het minivarken



Afbelding 2. Minivarken (man; leeftijd: 5-6 maanden; lichaamsgewicht: 11,1 kg). Afb. 2A: meerdere ECG-complexen laten een helder signaal zien dat werd verkregen met behulp van de ECG-necklace (zie ook Afb. 1A). Filterinstellingen waren geoptimaliseerd voor de mens en zouden aangepast kunnen worden voor het minivarken om nog betere resultaten te verkrijgen. Afb. 2B: ECG-complex met de karakteristieke golven en pieken (P, Q, R, S, T) gemeten met de Holst Centre draadloze ECG-sensor. Afb. 2C: veranderingen in de XYZ-acceleratie (pijlen) tijdens het optillen van het minivarken. (vergelijk de oriëntatie van de sensor in Afb. 1B (horizontaal) met 1A (onder kleine verandering van richtingshoek) en 1C). Afb. 2D: acceleratie van het minivarken tijdens bewegingen. Rond tijdstip 1500 seconden draait het dier om zijn as terwijl hij op vier poten staat, resulterend in een verschuiving van assen, m.n. de x-as (blauwe curve); zelfde gedragingen en daarmee gepaard gaande veranderingen in X-as worden op tijdstippen 2200 en 3200 seconden ook waargenomen. Afb. 2E: overeenkomsten zijn te vinden tussen de hartslag (bovenste paneel) en de activiteit over de drie acceleratieassen (onderste paneel). Wanneer rond de 1040 seconden de acceleratie stijgt is er ook een stijging te zien van de hartslag.

Daarnaast kan als doel in de toekomst miniaturisatie worden gesteld, waarbij de sensor geschikt wordt gemaakt voor andere – kleinere – dieren zoals de muis en de rat. Indien realiseerbaar, dan zal de bijdrage aan proefdiervermindering voor preklinisch biomedisch onderzoek nog aanzienlijk groter worden.

Op de langere termijn zal bovendien de kennis over het minivarken binnen het farmacologische veiligheidsonderzoek verder groeien. Het onderzoek met ratten en muizen daarentegen zou wel eens een steeds minder significante bijdrage kunnen gaan leveren binnen dit veiligheidsonderzoek en op den duur zelfs overbodig worden. Immers, wetgeving zoals richtlijnen voor dierexperimenteel preklinisch onderzoek, volgt in het algemeen de trend van de tijd en de stand van de wetenschap van het moment. Zo werd geïntroduceerd dat voor farmacologisch veiligheidsonderzoek naast onderzoek in een knaagdier ook onderzoek in een niet-knaagdier zoals hond of aap dient plaats te vinden. Zou het knaagdier op den duur kunnen vervallen dan zou een nog grotere bijdrage aan de vermindering van proefdieren gerealiseerd kunnen worden.

Literatuur

1. Huang L, Ashouei M, Yazicioglu F et al (2009). Ultra-Low Power Sensor Design for Wireless Body Area Networks: challenges, potential solutions and applications. *Int J Digital Content Technol Applic* 3/3: 136–148.
2. RETHINK Project: <http://www.rethink-eu.dk>
3. Bode G, Clausing P, Gervais F et al (2010). The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Meth* 62: 196–220.
4. Holst Centre ECG-Necklace:
<http://www.sciencedaily.com/releases/2009/09/090902122336.htm>
<http://www.holstcentre.com/en/NewsPress/PressList/ECGnecklace.aspx>

«

