

## Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-019

Ontvangen: 15-03-2011

|                        |                 |
|------------------------|-----------------|
| DEC datum goedkeuring# | Type aanvraag 2 |
| 16-03-2011             | Nieuw           |

|                         |
|-------------------------|
| VROM/GGONR <sup>3</sup> |
| IG: 06-105              |

|                        |
|------------------------|
| LNV/CBDNR <sup>4</sup> |
|                        |

|              |       |        |                       |      |               |          |         |
|--------------|-------|--------|-----------------------|------|---------------|----------|---------|
| Hoofdproject | CARIM | NUTRIM | Hersenen-en<br>gedrag | GROW | biomaterialen | Ander UM | Geen UM |
|--------------|-------|--------|-----------------------|------|---------------|----------|---------|

|             |    |  |  |  |  |  |  |
|-------------|----|--|--|--|--|--|--|
| Deelproject | 3. |  |  |  |  |  |  |
|-------------|----|--|--|--|--|--|--|

Financieel  
beheerder

Budgetnummer 30983225N

Titel van het onderzoek:

Vergelijking van SDF-, doorlichting-, en fluorescentiemicroscopie voor bepalen glycocalyx dimensies in cremaster microcirculatie in de muis

startdatum Februari 2011

einddatum 9 Januari 2015

Duur van de proef<sup>10</sup>: 18 weken

| Naam                                                 | Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM) | E-mailadres | Bevoegdheid <sup>5</sup> | Cap. groep /afdeling |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|--------------------------|----------------------|
| 1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)                 |                                       |             | Art.9                    |                      |
| 2. Vervanger VO (VVO)                                |                                       |             | Art.9                    |                      |
| 3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO <sup>7</sup> |                                       |             | Art.9                    |                      |
| 4. overige uitvoerenden                              |                                       |             | nl Art.12<br>Art.9       |                      |

| Diergroep                 | 1a        | 1b        | 2a        | 2b        | 3a        | 3b        |  |  |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|--|
| ctrl/exp/sham             | chow      | Hoog vet  | chow      | Hoog vet  | chow      | Hoog vet  |  |  |
| Diersoort                 | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        |  |  |
| Stam                      | C57Bl/6   | C57Bl/6   | FVB/NJ    | FVB/NJ    | FVB/NJ    | FVB/NJ    |  |  |
| Construct / mutatie ?     | -         | -         | -         | -         | Tie2-GFP  | Tie2-GFP  |  |  |
| Herkomst (leverancier) *  | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        |  |  |
| Aantal                    | 9         | 9         | 9         | 9         | 9         | 9         |  |  |
| Geslacht                  | m         | m         | m         | m         | m         | m         |  |  |
| Dieren immuuncompetent ?  | ja        | ja        | ja        | ja        | ja        | ja        |  |  |
| Leeftijd/gewicht          | 4-5 weken | 4-5 weken | 4-5 weken | 4-5 weken | 4-5 weken | 4-5 weken |  |  |
| Doel van de proef *       | 31        | 31        | 31        | 31        | 31        | 31        |  |  |
| Belang van de proef *     | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        |  |  |
| Toxicologisch onderzoek * | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        |  |  |
| Bijzondere technieken *   | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        |  |  |
| Anesthesie *              | 04        | 04        | 04        | 04        | 04        | 04        |  |  |
| Pijnbestrijding *         | 04        | 04        | 04        | 04        | 04        | 04        |  |  |
| Mate ongerief *           | 03        | 03        | 03        | 03        | 03        | 03        |  |  |
| Toestand dier einde exp*  | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        | 01        |  |  |

\* VHI-coderingen zie bijlage

# 1 Verantwoording

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

## **Titel: Vergelijking van SDF-, doorlichting-, en fluorescentiemicroscopie voor bepalen glycocalyx dimensies in cremaster microcirculatie in de muis**

### **1. Doel van de proef.**

*In voor geïnteresseerde en algemeen ontwikkelde leek begrijpelijke taal, bij voorkeur Nederlands, een korte omschrijving geven van aanleiding tot, doel van het onderzoek en gedegen inkadering in de onderzoekslijn of het wetenschappelijk project.*

De glycocalyx bekleedt de binnenkant van alle bloedvaten in het lichaam. De glycocalyx is opgebouwd uit polysacchariden geproduceerd door het endotheel met daaraan gebonden een verscheidenheid aan eiwitten uit het circulerende bloed. De binding van eiwitten uit het bloed geeft de glycocalyx zijn unieke *in vivo* eigenschappen: een gel-achtige laag van ~1 µm dik aan de binnenkant van de vaatwand die een barrière vormt voor het circulerende bloed, en daarmee een belangrijke rol speelt in vaatwandbescherming, doorbloeding, en uitwisseling van voedingsstoffen. Gezien deze rol zal het meten van glycocalyx veranderingen in patiënten informatie opleveren over vroege vaatwandproblemen. Onze groep is bezig met het ontwikkelen van een non-invasieve imaging techniek om glycocalyx dimensies te meten in mensen. Met behulp van een zg. SDF camera kunnen de stromende rode bloedcellen in de microcirculatie onder de tong in mensen worden afgebeeld maar is het niet mogelijk om ook de bloedvatwand af te beelden. Dit maakt het lastig om glycocalyx afmetingen direct te schatten uit de afstand van het circulerende bloed en het endotheel zoals in het verleden gedaan is met "klassieke" intravitaal microscopie. Echter, we denken dat het mogelijk is om met SDF op een indirecte manier de vaatwand positie te kunnen schatten, nl. door te kijken naar de grootte en frequentie waarmee de afgebeelde rode bloedcellen in de breedte van het vat waarin ze stromen bewegen in de tijd: bij een gezonde, dikke, glycocalyx zullen rode bloedcellen weinig kunnen bewegen in de breedte van het vat, maar in het geval van een kapotte glycocalyx hebben ze meer ruimte hiervoor. Ter validatie willen we in het huidige voorstel beelden van de microcirculatie in de cremaster spier van de muis die zijn opgenomen met de SDF camera gaan vergelijken met doorlichtingsbeelden en fluorescentiebeelden waarmee het mogelijk is om glycocalyx structuren en de vaatwand af te beelden. Het onderzoek maakt deel uit van , sectie

*Betreft het een pilot-experiment, een nieuw onderzoek of een vervolg op eerder onderzoek (DEC nr?), waarbij melding van resultaten.*

Het betreft nieuw onderzoek omdat de SDF camera nog niet in de cremaster gebruikt is en vergeleken is met doorlichtings- en fluorescentiemicroscopie, maar bouwt wel voort op bestaande DEC protocollen van onze groep. De SDF camera is in het verleden en wordt momenteel gebruikt in de kuitspier van muis en rat (DEC 2009-015 "Effect van glycocalyx beschadiging op insuline gevoeligheid in ratten", en DEC 2010-101 "Effect van glycocalyx therapie op insuline gevoeligheid in (pre-)diabetische muizen"). De resultaten van deze experimenten laten zien dat de breedte van de rode bloedcel kolom in de microvaten toeneemt tijdens insuline toediening en dat dit minder wordt na enzymbehandeling van de glycocalyx met hyaluronidase. Een rol voor de glycocalyx in de toename van het bloedvolume in de microcirculatie tijdens insuline toediening is bevestigd in DEC 2007-060 ("Effect van insuline op glycocalyx toegankelijkheid voor dextranen en insuline transport in cremaster capillairen van de muis" ) waarin we hebben gevonden dat insuline de toegankelijkheid van de glycocalyx voor grote dextranen vergroot.

*Vraagstelling/hypothese en opzet onderzoek in grote lijnen aangeven.*

De hypothese is dat SDF metingen, samen met de door ons ontwikkelde beeldanalyse, voldoende betrouwbare informatie geven over de eigenschappen van de glycocalyx, ondanks de beperking van het niet kunnen afbeelden van de vaatwand. De belangrijkste vraagstelling is of de berekende dimensies van de glycocalyx in de microcirculatie hetzelfde zijn wanneer deze gevisualiseerd wordt met SDF versus doorlichting en fluorescentie. De vraagstelling wordt getest in de cremaster spier van geanesthetiseerde

muizen waarin de microcirculatie beurtelings wordt gevisualiseerd m.b.v. de SDF camera, doorlichting, en fluorescentie microscopie. Na inductie van anesthesie worden muizen geïstrumenteerd met canules in de vene jugularis (voor toedienen fluorescente tracers) en carotis arterie (voor bloeddruk), en de cremaster wordt geprepareerd. De dikte van de glycocalyx wordt bepaald uit de afstand tussen passerende rode bloedcellen en het endotheel (afgebeeld mbv fluorescente endotheelmarker), terwijl de samenstelling en toegankelijkheid van de laag wordt gemeten met behulp van fluorescente tracers.

## 2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



*Wat is het belang van het onderzoek voor de gezondheid of voeding van mens of dier?*

*Is het onderzoek toegepast of fundamenteel? In geval van toegepast onderzoek dient de doelgroep en de extrapoleerbaarheid van de resultaten te worden vermeld: in welke mate is dit mogelijk en op grond waarvan is dit aannemelijk?*

Hart- en vaatziekten zijn een van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld, en gaan gepaard met grote kosten. Vroege herkenning en alternatieve therapieën van bloedvatbeschadigingen zijn essentieel voor het terugdringen van het aantal ziektegevallen. Een beschadigde glycocalyx is een vroege marker van vaatwandschade. De SDF camera biedt samen met de door ons ontwikkelde beeldanalyse mogelijkheden om bij patiënten op een eenvoudige en non-invasieve manier glycocalyx eigenschappen te meten. In het huidige onderzoek wordt deze methode gevalideerd met de "gouden" standaard van glycocalyx meting (doorlichting- en fluorescentiemicroscopie).

## 3. Alternatieven

*Argumentatie waarom Vervanging, Vermindering, Verfijning (3V's) niet mogelijk zijn.*

*Op grond van de WOD art. 10.1 (en in Europese wetgeving) is het verboden een dierproef te verrichten als het doel ook anders kan worden bereikt dan door middel van een dierproef (bijv. humaan materiaal), of door middel van een dierproef met minder dieren, of met minder ongerief.*

*Men dient expliciet aan te geven welke alternatieven zijn overwogen en waarom niet van deze alternatieven gebruik wordt gemaakt.*

Vervanging: De veronderstelde experimenten kunnen niet uitgevoerd worden op gekweekte endotheelcellen omdat deze geen volwaardige glycocalyx produceren. De glycocalyx in het lichaam bestaat naast suikerketens op het endotheel voor een belangrijk deel uit aan de suikers gebonden eiwitten uit het bloed. De SDF kan in mensen onder de tong worden gebruikt maar doorlichtingsbeelden zijn in de mens niet mogelijk.

Vermindering: SDF, doorlichting en fluorescentiemicroscopie zullen in eenzelfde preparaat gemeten worden, terwijl enzymbehandeling met hyaluronidase ook gepaard gemeten zal worden binnen eenzelfde preparaat. Elk dier kan daarmee zijn eigen controle vormen, en het aantal benodigde dieren wordt hiermee beperkt.

Verfijning: Het dier is tijdens het experiment onder anesthesie, en het ongerief blijft beperkt tot de initiële injectie van anestetica.

## 4. Ethische afweging

*Welke argumenten rechtvaardigen het belang van dit onderzoek tegenover het gebruik van deze proefdieren, gelet op hun aantal en het te verwachten ongerief?*

*De DEC heeft tot taak de ethische toelaatbaarheid van specifieke dierproeven te toetsen aan zekere afwegingsnormen en uitvoeringscriteria. De DEC dient aan de vergunninghouder te adviseren of het wetenschappelijk, maatschappelijk en/of patiëntenbelang van een concrete dierproef opweegt tegen het ongerief voor de proefdieren met hun intrinsieke waarde.*

Gezien het hoge percentage sterfgevallen en invaliditeit en gepaard gaande medische kosten als gevolg van hart- en vaatziekten is een verbetering van inzicht in én vroege opsporing van de vasculaire processen die een rol spelen bij het ontstaan van deze ziekten van groot maatschappelijk belang. De geplande dierexperimenten richten zich op ontwikkeling van de methodiek om vroege glycocalyx schade op te sporen,

en leveren tevens inzicht in de functionerende fysiologie van de microcirculatie en glycocalyx. Vanwege het grote maatschappelijke belang zijn de voorgestelde dierexperimenten met een ongerief dat geschat wordt als matig, aanvaardbaar. De voorgestelde experimenten vinden plaats onder algehele anesthesie van het proefdier, en het ongerief voor het proefdier blijft beperkt tot de initiële injectie van het anestheticum.

## Wetenschap

### 5. Wetenschappelijke onderbouwing

*Motivatie en beschrijving van het onderzoek met een wetenschappelijke onderbouwing. Met beknopte lijst van referenties.*

De glycocalyx is een gel-achtige laag van  $\sim 0.5 \mu\text{m}$  aan de binnenkant van de bloedvaten (1). De laag is opgebouwd uit langvormige suikerketens met daarin gevangen allerhande eiwitten uit het bloed. Experimentele studies hebben laten zien dat de glycocalyx de vaatwand beschermt en dat schade aan de glycocalyx de aanzet kan zijn tot een verhoogde plakkerigheid van de vaatwand voor witte bloedcellen en bloedplaatjes (2), een verhoogde lekkage van eiwitten door de vaatwand (3), en een verminderde NO productie door het endotheel (4). Vroegtijdige veranderingen in de glycocalyx kunnen daardoor de eerste aanzet zijn tot vaatwandproblemen en vasculaire schade. Samen met de door onze groep ontwikkelde beeldanalyse kunnen sublinguale metingen van de microcirculatie met een SDF camera in de toekomst een relatief eenvoudige, non-invasieve methode vormen om bij patiënten vroegtijdige glycocalyx schade op te sporen (5), maar moeten eerst gevalideerd worden omdat met deze metingen de vaatwand niet gevisualiseerd kan worden. Het idee achter de analyse is dat de glycocalyx onder controle condities beperkt toegankelijk is voor het stromende bloed maar dat deze toegankelijkheid toeneemt wanneer de glycocalyx beschadigd is (6). In het voorgestelde onderzoek willen we de SDF metingen + beeldanalyse vergelijken in de cremaster spier van de muis met "standaard" intravitaal microscopische metingen van glycocalyx dikte en toegankelijkheid d.m.v. doorlichting en fluorescentie microscopie (7). Om de exacte locatie van het endotheel te visualiseren zullen de metingen gedaan worden in transgene muizen met een fluorescente endotheel marker of het endotheel worden aangekleurd met een membraan tracer. Om de rol van de glycocalyx te onderzoeken, zal de glycocalyx beschadigd worden d.m.v. een intraveneuze enzymbehandeling met hyaluronidase (8). Ook zullen diabetes-gerelateerde microvasculaire beschadigingen opgewekt worden door muizen op een hoog vet dieet te plaatsen gedurende 18 weken.

### 6. Wetenschappelijke beoordeling

*Is het project door een onafhankelijke instantie (extern) op zijn wetenschappelijke merites beoordeeld (peer review) en door wie (goedkeuring bijvoegen)?*

*Goedkeuring van een onderzoekslijn kan niet als een geheel onafhankelijke beoordeling worden aanvaard. Wie is de principal investigator voor het project.*

*Als de wetenschappelijke beoordeling niet is gewaarborgd, kan de DEC extern buiten de UM aan een onafhankelijke, erkend deskundige vertrouwelijk om advies vragen.*

De principal investigator van de  
DEC protocol goedgekeurd.

n als geheel is

-lij heeft het huidige

Proefdier

### 7. Proefdier keuze

*7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming*

*Species en gewenste stam, transgeen, knock-out aangeven. Bij gebruik van genetisch gemodificeerde dieren het genotype aanduiden.*

*Motiveer de keuze van de gebruikte diersoort.*

Muis. De cremaster spier van de muis is slechts enkele spierlagen dik en geschikt voor intravitaal microscopie van de microcirculatie. Er is veel ervaring bij de onderzoekers met dit model wat betreft

cremaster preparatie en visualisatie, en canulatie van vene jugularis en arteria carotis. Studies worden uitgevoerd in C57Bl/6 muizen omdat hier het meeste ervaring mee is alsmede met FVB muizen omdat hier een transgene model van is met een fluorescente (GFP) endotheel marker (Tie-2/Tek).

*Herkomst expliciet vermelden; heeft leverancier fok/afleververgunning of is sprake van een vrijgestelde diersoort?*

*Hergebruik: wordt een reeds eerder benut proefdier gebruikt?*

Harlan: C57Bl/6

The Jackson Laboratory: STOCK Tg(TIE2GFP)287Sato/J (GFP-Tie2) & FVB (control).

Leveranciers hebben een fok- en afleververgunning.

*Wat is de uiteindelijke bestemming van het dier na de proef?*

Na de proef zal het dier opgeofferd worden.

#### 7b. Sexe

*Omdat het dierexperiment extrapoleerbaar dient te zijn voor de mens in beide geslachten, worden - ook om onnodige fok te voorkomen- in principe beide geslachten in het dierexperiment at random opgenomen tenzij dit om duidelijke redenen niet toelaatbaar is.*

*Het gebruik van één sexe ter wille van vergelijkbaarheid met vorige experimenten is op zich niet valide.*

Deze experimenten kunnen alleen gedaan worden in mannetjes muizen door de aanwezigheid van een cremaster spier in de mannelijke sexe.

#### 7.c. Aantallen

*Het totale aantal is de som van aantal groepen (zie ad 7.) maal groeps grootte + uitval.*

*Indien mogelijk moet gebruik worden gemaakt van historische controles; de groeps grootte van de controles kan daardoor fors worden gereduceerd; een historische controlegroep zal mogelijk groter zijn -de populatie is dan beter gedefinieerd- waardoor men kan volstaan met een kleinere experimentele groep met het ongerief. Groeps grootte en keuze van parameters dient men te onderbouwen. Groeps grootte is afhankelijk van o.a. een- of tweezijdig toetsen,  $\sigma$  (spreiding),  $\delta$  (beoogd effect), gewenste power (0,80 tenzij dit niet volstaat).*

Uit onze vorige studies naar glycocalyx dimensies in cremaster capillairen vonden we in controle C57Bl/6 muizen een glycocalyx dikte, d.w.z. de afstand van de rode bloedcel kolom tot de vaatwand, van  $0.55 \pm 0.09$  ( $\sigma$ )  $\mu\text{m}$  en in ernstig hyperlipidemische ApoE3-Leiden muizen een dikte van  $0.30 \pm 0.09$   $\mu\text{m}$  (9). Deze muizen hebben een afwijkende ApoE receptor waardoor ze geen LDL in de lever kunnen opnemen en hun vethuishouding snel verstoord raakt. In de huidige studie gebruiken we muizen met een normale levercapaciteit voor LDL. We gaan daarom uit van een relevant effect op glycocalyx dimensies wanneer t.g.v. het hoog vet dieet de glycocalyx dikte afneemt met tenminste 0.15  $\mu\text{m}$  ( $\delta$ ). Met een power van 0.8, en een type 1 fout van 0.05 ( $\alpha$ ), komen we uit op een groeps grootte van 7 waarnemingen voor een statistisch verschil ( $P < 0.05$ ) bij ongepaarde metingen.

Geschatte uitval (oorzaken: beschadiging cremaster bij preparatie; achteruitgang/beschadiging glycocalyx in de tijd) is 20%.  $a = 7 / 0.8 = 9$  dieren per groep. Voor 6 verschillende experimenten (zie 8) komen we dan uit op 54 dieren.

## 8. Experiment

*De wetenschappelijke en methodologische kwaliteit van de experimenten moet duidelijk blijken, b.v. ook of er bij de steekproeftrekking randomisatie plaatsvindt, of dat er geblindeerd wordt t.a.v. de groepen.*

*De proefopzet (structuur) van het experiment zodanig aangeven dat de rol van de verschillende experimentele groepen voor de beantwoording van de vraagstelling duidelijk wordt. Welke (pos. en neg.) controlegroepen, shamgroepen en experimentele groepen zijn noodzakelijk. Is het mogelijk van historische controles (uit eerdere experimenten) gebruik te maken?*

*Het verloop van de experimenten geeft men aan door middel van een flowchart waarin is te zien wanneer wat met hoeveel en welke dieren plaatsvindt. De vorm waarin deze wordt gegoten kent vele varianten: van tijdsbalk tot organogram.*

*Een exacte beschrijving geven van alle handelingen, aantal, aard en duur van ingrepen die het proefdier of groep proefdieren moet ondergaan.*

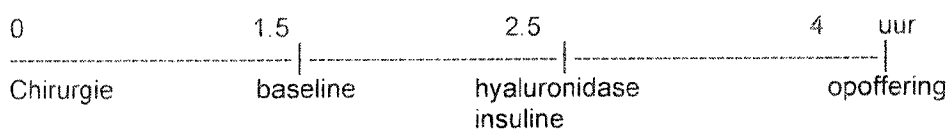
### Beschrijving experiment

Op de eerste dag van het experiment worden muizen (4-5 weken uit) op normaal dieet (chow, helft van de dieren) gezet of op een hoog vet dieet (helft van de dieren) gedurende 18 weken om diabetes te induceren. Diabetes gaat gepaard met microvasculaire (en glycocalyx) schade. Na 18 weken vindt het cremaster experiment plaats. De muis wordt d.m.v. i.p. injectie onder anesthesie gebracht, vervolgens worden katheters in de vena jugularis en arteria carotis gebracht, en de rechter cremaster spier vrijgeprepareerd (zie SOP aan eind). Met SDF, doorlichting en fluorescentie microscopie worden beurtelings beelden opgenomen van de microcirculatie en na het experiment geanalyseerd op glycocalyx dimensies. De totale duur van een experiment op een dag is ~4 uur (1.5 uur cremaster preparatie en stabilisatie, ~2.5 uur metingen).

### Verloop experimenten

Muizen worden gedurende 18 weken gehuisvest en krijgen ofwel normaal dieet (chow) of een hoog vet dieet.

In elke cremaster experiment worden initeel controle (baseline) metingen gedaan (~1 uur) waarna de glycocalyx gechallenged wordt door een intraveneuse toediening van het enzym hyaluronidase of insuline, en de metingen vervolgd (~1.5 uur).



Deze metingen zullen gedaan worden in C57/Bl6 muizen, FVB muizen, en FVB muizen met een GFP marker in hun endotheel. De helft van de muizen zal een hoog vet dieet krijgen om diabetes-gerelateerde microvasculaire en glycocalyx beschadigen te induceren. C57Bl/6 muizen dienen als referentie omdat hier de meeste informatie is op glycocalyx gebied. GFP-Tie 2 muizen hebben een FVB achtergrond, en in deze stam is weinig informatie mbt functie en structuur van de glycocalyx beschikbaar. Bij gebrek aan GFP in het endotheel, zal het endotheel in C57Bl/6 muizen geschat worden door een membraan marker (Dil) intraveneus in te spuiten.

## 9. Experimentele condities

### 9a. Anesthesie

*Indien van toepassing dient de keuze van anesthesie gemotiveerd en beschreven te worden: techniek, middel, dosering (mg/kg L.G.), wijze van toediening.*

*Als geen anesthesie wordt toegepast, dit toelichten.*



Initieel: ketamine 125 mg/kg + Medetomidine 0.2 mg/kg + Atropine 0.5 mg/kg (I.P., eenmalige injectie)  
Additioneel: ketamine 35 mg/kg/h + Medetomidine 35 ug/kg/h + Atropine 0.125 mg/kg/h (I.P., continu infuus)

### 9b. Pijnbestrijding

*Hiertoe wordt gerekend de pre- en/of postoperatieve pijnbestrijding, anders dan de pijn dempende werking van het anestheticum. Opgeven welke pijnstiller, dosis (in mg/kg L.G.) met werkingsduur, wijze van toediening en gedurende welke termijn.*

*Als dieren pijn hebben, moeten pijnstillers toegediend te worden, tenzij de onderzoeker kan aantonen dat dit interfereert met de proef (WOD art. 13). Methode van pijnregistratie aangeven.*

Zie 9a.

### 9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- *De wijze van euthanaseren dient beschreven te worden.*

Na afloop van het experiment zal, terwijl het dier nog steeds onder anesthesie is, euthanasie toegepast worden d.m.v. verbloeden en het doorknippen van het diafragma.

- *Aangegeven moet worden op welk moment (op basis van welke criteria) men overgaat tot het verantwoord doden van het betrokken proefdier ("humane eindpunten" voor voortijdig doden).*

Tijdens de 18 weken periode van dieet zal het ongerief bij de dieren bijhouden worden. Er wordt verwacht dat het ongerief tijdens deze periode niet hoger zal worden dan 03 (complicaties tgv het hoog vet dieet). Als buiten het verwachte ongerief de conditie van de dieren slechter wordt en ernstig tot zeer ernstig ongerief wordt geconstateerd (gelet op houding, activiteit, vacht) of wanneer er een gewichtsverlies van >20% optreedt, dan zullen de dieren door de VO en/of overige uitvoerende opgeofferd worden. De 20% gewichtsverlies zal afgeleid worden aan de hand van de te verwachten gewichtscurve.

## Zorg

### 10a. Ongerief



*De te verwachten aard, mate en duur van het ongerief voor dieren omschrijven. Dit is het totaal van alle handelingen (wat, wanneer, hoelang, hoe vaak) dat het dier ondergaat. Het solitair huisvesten van knaagdieren dient te worden verantwoord.*

*De score voor ongerief inschatten aan de hand van diverse fase's van het onderzoek (voorbereiding, exp. handelingen, frequentie, tijdsduur, nazorg, huisvesting). De hoogste score bepaalt het ongerief.*

*Voorbeeld:*

*Herhaalde i.p. injecties geven een hoog ongerief en moeten worden voorkomen.*

*Openthorax chirurgie is een ernstig ongerief (05).*

*Weke delen chirurgie b.v. vasectomie is ongeriefcode 04.*

*Een terminaal experiment onder narcose is code 02.*

*Zeer ernstig ongerief is alleen toelaatbaar als sprake is van essentiële behoefte.*

|               |      |
|---------------|------|
| Gering        | = 01 |
| Gering/matig  | = 02 |
| Matig         | = 03 |
| matig/ernstig | = 04 |
| Ernstig       | = 05 |
| Zeer ernstig  | = 06 |

Hoog vet dieet en inductie diabetes: 03

I.P. injectie anestheticum: 03

Terminaal experiment onder narcose: 02

Totale ongerief: 03

### 10b. Welzijnsevaluatie

*Als een vergelijking met eerdere experiment(en) mogelijk is, een evaluatie van welzijn en ongerief opnemen.*

Uit vorige experimenten blijkt dat het voorgestelde protocol een goede anesthesie geeft met stabiele

hemodynamica, en het ongerief beperkt blijft tot de initiële injectie.

### 11. Verzorging en huisvesting

*Onder welke condities moeten de dieren worden gehuisvest. Hierbij ondermeer denken aan bijzondere (metabole) kooien, solitaire huisvesting gedurende een bepaalde tijd, gerichte voeding, antibiotica, extra aandacht. Op welke locatie worden de experimenten verricht en waar worden dieren gehuisvest?*

*De onderzoeker draagt de eerste verantwoordelijkheid voor de controle op de dieren in proef; wie dient te worden gewaarschuwd bij calamiteiten?*

De muizen worden sociaal gehuisvest en verzorgd in de Centrale Proefdier Voorziening (CPV) van de UM. De muizen kunnen gehuisvest worden in standaard kooien, zonder speciale maatregelen (water en voeding ad libitum); de helft van de dieren zal hoog vet dieet krijgen en uiteindelijk diabetes. Als gevolg van de diabetes zullen dieren meer drinken en plassen, waardoor bakken vaker verschoond moeten worden en drinkwater vaker aangevuld. De experimenten worden verricht in het laboratorium voor . Bij calamiteiten dient ; gewaarschuwd te worden.

### 12. Deskundigheid

*Het ontwerpen en uitvoeren van een dierproef is wettelijk geregeld (WOD art. 9 en 12). Deskundigheid is te onderscheiden in bevoegdheid en bekwaamheid. Geef aan of sprake is van voldoende bekwaamheid in het doen van de ingrepen blijkens ervaring.*

Alle betrokken onderzoekers zijn bevoegd en bekwaam in hun deskundigheid aangaande de voorgestelde experimenten (operatie en metingen).

*Is er een voornemen een ervaren (buitenlands) medewerker (niet art.9) of een student te laten participeren onder voortdurend begeleidend toezicht van een bevoegd persoon? Geef aan voor welke handelingen.*

Neen.

### 13. Standard Operation Procedures (SOP)

*Aard, frequentie en plaats van toediening, dosering in gewichtshoeveelheden, enz.*

*Van iedere operatie of techniek dient een SOP als bijlage toegevoegd te worden, waarin exact de gehele procedure beschreven dient te worden: wijze van anesthesie incl. voorbereiding, doseringen, hechtmateriaal, wijze van hechten etc.*

*Maak zo mogelijk integraal gebruik van geregistreerde SOP's ([www.cpv.unimaas.nl](http://www.cpv.unimaas.nl)) en volsta met verwijzing hiernaar.*

*Het verdient aanbeveling gebruik te maken van de Code of Practice (van het CPV) en afwijkingen hierop expliciet te vermelden.*

Voor gebruikte SOP wordt u verwezen naar bijgevoegde bijlage.

### Relevante literatuur

*Eventueel een kopie bijvoegen.*

- 1) Van Teeffelen JW, Brands J, Stroes ES, and Vink H. Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels. *Trends in cardiovascular medicine* 17: 101-105, 2007.
- 2) Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23(9):1541-1547, 2003.
- 3) Huxley VH, Williams DA. Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments. *American journal of physiology* 278(4):H1177-1185, 2000.

- 4) VanTeeffelen JW, Brands J, Jansen C, Spaan JA, and Vink H. Heparin impairs glycocalyx barrier properties and attenuates shear dependent vasodilation in mice. *Hypertension* 50: 261-267, 2007.
- 5) Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, Ince C, Broekhuizen LN, Kastelein JJ, Stroes ES, and Vink H. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *Journal of applied physiology* 104(3): 845-852, 2008.
- 6) Van Teeffelen JW, Brands J, Stroes ES, and Vink H. Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels. *Trends in cardiovascular medicine* 17: 101-105, 2007
- 7) Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *American journal of physiology*. Jan 2000;278(1):H285-289.
- 8) Henry CB and Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *American journal of physiology* 277: H508-514, 1999.
- 9) Constantinescu A, Spaan JA, Arkenbout EK, Vink H, and VanTeeffelen JW. Degradation of the glycocalyx is associated with chylomicron leakage in mouse cremaster microcirculation. *Thrombosis and haemostasis* 105(3): 2010
10. VanTeeffelen JW, Constantinescu AA, Brands J, Spaan JA, and Vink H. Bradykinin- and sodium nitroprusside-induced increases in capillary tube haematocrit in mouse cremaster muscle are associated with impaired glycocalyx barrier properties. *The Journal of physiology* 586: 3207-3218, 2008.

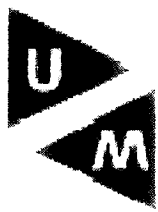
## Bijlage

### *SOP Cremaster in muis*

Algehele narcose wordt geïnduceerd door middel van intraperitoneale (i.p.) injectie van 125 mg/kg lichaamsgewicht ketamine, 0.2 mg/kg medetomidine en 0.5 mg/kg atropine. Deze narcose is voldoende voor de eerste 30-45 minuten. Nadat de narcose is ingetreden wordt de hals, de rechter lies en het scrotum van de muis geschoren. De ogen worden behandeld met oogzalf. Via een rectaalprobe wordt de lichaamstemperatuur gemeten; deze wordt tijdens het gehele experiment gehandhaafd op 37°C m.b.v. een warmtelamp die gekoppeld is aan de rectaalprobe. Vervolgens wordt in de hals van de muis de trachea vrijgeprepareerd en een tube ingebracht om de ademhaling te vergemakkelijken. De vena jugularis wordt gecanuleerd (PE10 catheter) voor toediening van vocht/farmaca. Een PE10 catheter wordt ingebracht in de arteria carotis voor het meten van de arteriële bloeddruk. Onderhoudsanesthesie wordt gegeven d.m.v. een continu i.p. infuus van ketamine (35 mg/kg/h), medetomidine (35 ug/kg/h) en atropine (0.125 mg/kg/h).

Vervolgens wordt de rechter cremasterspier vrijgeprepareerd. Hiertoe wordt een huid incisie gemaakt van de iliaca anterior superior tot aan het distale uiteinde van het scrotum. De testis en de intacte cremasterspier worden vervolgens voorzichtig vrijgeprepareerd van het scrotum. Over het ventrale oppervlak van de cremasterspier wordt een kleine incisie gemaakt met behulp van een thermale microcautery, waarna de spier wordt losgeprepareerd van de testis; de testis wordt vervolgens in de buik geschoven. De cremasterspier wordt daarna uitgespreid en gefixeerd op een plexiglas platform dat past onder de intravitaal microscopische opstelling. Tijdens de gehele preparatie procedure en ook gedurende de rest van het experiment, wordt het spierweefsel bevochtigd en op temperatuur gehouden d.m.v. superfusie met een gebufferde bicarbonaat oplossing van 34°C. De muis wordt overgeplaatst naar de intravitaal microscoop. Voordat de microscopische metingen beginnen wordt een rustperiode van 30 minuten ingelast om de cremasterspier te laten herstellen van de preparatie.

Na afloop van het experiment wordt de muis, nog steeds onder anesthesie, geofferd door middel van doorbloeding en doorknippen middenrif.



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, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Vergelijking van SDF-, doorlichting-, en fluorescentiemicroscopie voor bepalen glycocalyx dimensies in cremaster microcirculatie in de muis*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Op het voorblad ontbreekt de naam van de GGO medewerker. De DEC verzoekt dit nog in te vullen.
- Bij punt 7c is het voor de DEC niet duidelijk hoe de aantallen per groep worden berekend. De DEC verzoekt dit te verduidelijken.
- De DEC verzoekt de criteria voor de humane eindpunten beter te definiëren bij punt 9c.

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 2011-019, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Van: m  
Aan: DEC-UM

Betreft: wijziging Project 2011-019

Maastricht, 17-02-2011

Beste,

N.a.v. brief dd 02-02-2011, heb ik de projectaanvraag "*Vergelijking van SDF-, doorlichting-, en fluorescentiemicroscopie voor bepalen glycocalyx dimensies in cremaster microcirculatie in de muis*" aangepast op de door uw voorgestelde punten. Deze punten waren:

- \* Op het voorblad ontbreekt de naam van de GGO medewerker. De DEC verzoekt dit nog in te vullen.

De naam van de GGO medewerker (   ) is toegevoegd.

- \* Bij punt 7c is het voor de DEC niet duidelijk hoe de aantallen per groep worden berekend. De DEC verzoekt dit te verduidelijken.

Deze alinea is herschreven (zie tekst). Er wordt uitgegaan van een relevant effect van het hoog vet dieet op glycocalyx dikte van  $0.15 \mu\text{m}$  ( $\delta$ ). Met een power van 0.8, en een type 1 fout van 0.05 ( $\alpha$ ), komen we uit op een groepsgrootte van 7 experimenten voor een statistisch verschil ( $P < 0.05$ ) bij ongepaarde metingen.

- \* De DEC verzoekt de criteria voor de humane eindpunten beter te definiëren bij punt 9c.

Alinea is herschreven (zie tekst). Als buiten het verwachte ongerief de conditie van de dieren slechter wordt en ernstig tot zeer ernstig ongerief wordt geconstateerd (gelet op houding, activiteit, vacht) of wanneer er een gewichtverlies van  $>20\%$  optreedt, dan zullen de dieren door de VO en/of overige uitvoerende opgeofferd worden.

De aanpassingen in het protocol en op in het voorblad zijn in grijs gemarkeerd.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht  
17-03-2011

Project: *Vergelijking van SDF-, doorlichting-, en fluorescentiemicroscopie voor bepalen glycocalyx dimensies in cremaster microcirculatie in de muis.*

DEC-UM  
Voorzitter DEC-UM  
1  
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

Hierbij 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.

Projectnummer: 2011-019  
Diersoort: muis  
Aantal dieren: 54  
Einddatum: 16-03-2015

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

Vice-Voorzitter DEC-UM