24

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-061

Ontvangen: 03-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag [2]
03-05-2011	Nieuw / Herz.versie / **Pilot**

VROM/GGONR[3]	LNV/CBDNR[4]

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			

Financieel beheerder		Budgetnummer	3098.3316B

Titel van het onderzoek:

MicroSPECT van myocardiale perfusie en celdood na myocardiaal infarct

startdatum 01-05-2011 einddatum [9] 01-05-2015 *Duur van de proef [10]:* *8 dgn*

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegd-heid[5]	Cap. groep /afdeling
1.Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.12	
3. Verantwoorde-lijk medewerker (VM) GGO[7]					
4. Overige uitvoerenden					
5.PI				Art.9	

Diergroep	1	2		.	.	.	.
ctrl/exp/sham	ctrl	**exp**					
Diersoort	01	**01**					
Stam	Swiss	**Swiss**					
Construct / mutatie ?	-	-					
Herkomst (leverancier) *	01	**01**					
Aantal	6	**15**					
Geslacht	mnl	**mnl**					
Dieren immuuncompetent ?	ja	**ja**		ja/nee[8]	ja/nee[8]	ja/nee[8]	ja/nee[8]
Leeftijd/gewicht	± 12 wkn	**± 12 wkn**					
Doel van de proef *	31	**31**					
Belang van de proef *	01	**01**					
Toxicologisch onderzoek *	01	**01**					
Bijzondere technieken *	01	**01**					
Anesthesie *	04	**04**					
Pijnbestrijding *	04	**04**					
Mate ongerief *	05	**05**					
Toestand dier einde exp*	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: MicroSPECT van myocardiale perfusie en celdood na myocardiaal infarct

1. Doel van de proef.

Pilot experimenten ter evaluatie van de technische mogelijkheden van een recent aangeschaft microSPECT systeem ontwikkeld voor kleine proefdieren (U-SPECT-II, MILabs). Daarnaast dienen de experimenten om alle apparatuur (U-SPECT-II, triggering units, anesthesie unit) te testen en te doorgronden en zo mogelijk onnodig uitval van dieren in toekomstige experimenten te voorkomen.

Als diermodel worden muizen met een een myocardiaal infarct gebruikt. Hierin worden gelijktijdig doorbloeding (perfusie) en celdood (apoptose) van de hartwand gevisualiseerd. Triggering op hartslag (ca 500 bpm) en ademhaling (250-400 bpm) zijn noodzakelijk om een stabiel beeld te genereren. Om tegelijktijdig perfusie en apoptose te visualiseren worden verschillende tracers/isotopen met verschillende energie gelijktijdig geïnjecteerd. Technisch gezien zijn dit veeleisende en relatief complexe experimenten en zullen worden uitgevoerd in aanwezigheid van een medewerker van MILabs. Binnen de UM is geruime ervaring opgedaan met het diermodel.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Testen van een microSPECT systeem op een muismodel van myocard infarct. De beeldvorming is technisch gezien veeleisend en relatief complex. Indien de setup onder de knie is, zullen op grotere schaal experimenten uitgevoerd worden in verschillende (kleine) diermodellen van neo-vascularisatie. Deze experimenten zullen gebruikt worden als uitgangspunt ter extrapolatie naar humane studies.

3. Alternatieven

Experimenten dienen *in vivo* te worden uitgevoerd om zo de mogelijkheid van toekomstige longitudinale studies te valideren. In een *ex vivo* setup kunnen fysiologische parameters onvoldoende worden nagebootst. De muis is een veel gebruikt en sterk reproduceerbaar model voor myocardiaal infarct. MicroSPECT maakt het mogelijk om meerdere tracers gelijktijdig te visualiseren, wat het mogelijk maakt verschillende aspecten van een ziekte, bijv. perfusie en celdood na myocardiaal infarct, in één enkele scan te visualiseren. Dit vermindert het aan proefdieren aanzienlijk. Een humane studie is met deze scanner niet mogelijk.

4. Ethische afweging

Het ongerief van de dieren met een myocardiaal infarct is niet gering. De dieren krijgen derhalve pijnbestrijding en zullen continu worden gemonitord. Het aantal dieren (21 in totaal, uitval inachtnemend) achten wij noodzakelijk om een goed beeld te krijgen van de technische mogelijkheden van de microSPECT scanner. Daarnaast zullen enkele tracers worden gesynthetiseerd en getest in dieren, ter extrapolatie naar (pre-klinische) humane studies.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Visualisatie van moleculaire, functionele en morfologische aspecten van cardiovasculaire aandoeningen vergroten de kwaliteit van de diagnose. MicroSPECT maakt het mogelijk om in vivo gelijktijdig met hoge gevoeligheid deze aspecten na bijvoorbeeld een myocardiaal infarct te visualiseren door gebruikmaking van verschillende tracers. Op zeer kleine schaal is de aangeschafte U-SPECT-II scanner reeds toegepast om botten, nieren en tumoren in vivo te scannen [Van der Have, J Nucl Med 2009]. Echter, de U-SPECT-II kent slechts weinig cardiovasculaire toepassingen. Klinische SPECT scanners zijn succesvol toegepast in humane studies [Golestani, Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010], zij het in de meeste gevallen met een enkele tracer. Deze pilot experimenten dienen om de mogelijkheden van de U-SPECT-II te evalueren in de in vivo visualisatie van een sterk dynamisch orgaan (hart met myocardiaal infarct) van een muis die geïnjecteerd wordt met meerdere tracers. Voor visualisatie van de perfusie van hartspierweefsel zal gebruik worden gemaakt van voor visualisatie van apoptotisch hartspierweefsel zal gebruik worden gemaakt van

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit pilot-project is ontwikkeld in samenwerking en intensieve samenspraak met binnen CARIM, met MILabs en de van het azM en is door deze groepen beoordeeld en akkoord bevonden. Dit pilot-project is door PI) wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd.

7. **Proefdier keuze**

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

Er worden volwassen wildtype Swiss muizen gebruikt aangezien hiermee ruime ervaring is binnen de UM. Deze dieren zijn afkomstig van Charles River. Na afloop van de experimenten worden de dieren opgeofferd.

7b. **Sexe**

Estrogenen, waarvan de bloedconcentratie tussen vrouwelijke muizen onderling varieert, stimuleren neo-vascularisatie in skeletspierweefsel [Kyriakides, Cardiovasc Res 2001]. Het is bovendien bekend dat estrogeen antagonisten *in vitro* celdood van endotheelcellen induceren [Soares, Ultrastruct Pathol 2003] en tumorgroei reduceren in muizen [Sacco, Gene Ther 2002]. Daar neo-vascularisatie een belangrijke rol speelt in het herstelmechanisme na een myocaridaal infarct is deze aanvraag enkel voor mannelijke muizen.

7.c. **Aantallen**

- Groep 1: 5 (**exclusief uitval**) dieren zonder myocardiaal infarct – single tracer
- Groep 2a: 5 (**exclusief uitval**) dieren met myocardiaal infarct – single tracer
- Groep 2b: 5 (**exclusief uitval**) dieren met myocardiaal infarct – dual tracer

Eerst zullen gezonde dieren gescand worden na injectie van een perfusie-tracer om de gehele setup te testen. Daarna zullen dieren met een myocardiaal infarct gescand na injectie van een perfusie-tracer om te kijken er verschillen met de gezonde dieren gevisualiseerd kunnen worden. Vervolgens zullen dieren met een myocardiaal infarct geïnjecteerd worden met een perfusie-tracer en een celdood-tracer om te kijken of de U-SPECT-II het mogelijk maakt om in één enkele scan een overzicht te krijgen van de perfusie én schade (celdood) van myocardiaal weefsel na infarct.

Bij dieren met een sham OK (Groep 1) wordt, op basis van eerdere ervaringen uit DEC Oostendorp 2008), een uitvalspercentage van 10% verwacht → 5/0.9 = 6 muizen.
Bij dieren met een myocardiaal infarct (**Groep 2a en 2b kunnen mbt tot uitval worden samengevoegd tot Groep 2, zoals vermeld op het voorblad, daar de injectie van de tracer geen invloed heeft op het uitvalspercentage**) wordt, op basis van eerdere ervaringen uit DEC Oostendorp 2008, een uitvalspercentage van 30% verwacht → 10/0.7 = 15 muizen.

Deze aanvraag is voor in totaal 6 + 15 = 21 muizen.

Uitval wordt gereduceerd door de OK's uit te laten voeren door een ervaren persoon (AW), die bij vele muizen een myocardiaal infarct heeft gezet. Daarnaast zullen de muizen nauwlettend in de gaten worden gehouden tijdens en na het ontwaken uit de anesthesie zodat er adequaat en snel gereageerd (bijv. middels beademing of pijnbestrijding) kan worden als de muis in een kritieke toestand (bijv. ademhalingsproblemen of hevige pijn) geraakt.

8. Experiment

Groep	OK	Contrast	
1.	Controle (sham OK)		(perfusie)
2a.	Myocardiaal infarct		(perfusie)
2b.	Myocardiaal infarct		(perfusie)
		(celdood)	

Anesthesie OK Anesthesie microSPECT Euthanasie

Dag 0 Dag 8

Procedure 1 uur Procedure max 5 uur

De muizen worden random over de groepen verdeeld. Tijdens de OK en microSPECT worden de muizen op een warmtemat geplaatst. Tijdens microSPECT worden hartslag- en ademfrequentie continu gemonitord.

(werkzaam per juni 2011 bij , azM) en (klinisch fysicus azM) zullen assisteren tijdens de experimenten, maar niet in aanraking komen met de muizen.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Inductie anesthesie met 3-4% isofluraan

Onderhouden van anesthesie tijdens microSPECT met 2-2.5% isofluraan

9b. Pijnbestrijding

Pre- en 24 uur post-operatief buprenorfine (Buprenorfine 0.03-0.05mg/kg LG sc, iedere 8-12 uur).

Pre- en 72 uur post-operatief NSAID (carprofen 5mg/kg LG sc, 1 maal per 24 uur) [PA Flecknell Behav Pharmacol. 2004].

Voorafgaand aan microSPECT: buprenorfine (0.05mg/kg LS sc, eenmalig).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Overdosis pentobarbital ip

Voortijdige euthanasie bij:

- iedere conditie die resulteert in een verlengde of onomkeerbare beperking tot eten/drinken
- ziektes/condities die ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren en niet weggenomen kunnen worden middels analgetica.
- Snelle of continu gewichtsverlies (>20%)
- Gegeneraliseerde afname in zelfverzorging over lange periode
- Ernstig of continu respiratoir ongerief
- Bewijs voor microbiële infecties/andere ziektes die interfereren met experiment protocol, een van bovenstaande punten veroorzaken of niet behandelbaar zijn.

Zorg

10a. Ongerief

Aard	Groep	Ernst	Duur	Frequentie
OK (sham)	1	04	30min	1x
OK (myocard infarct)	2a+2b	04	30min	1x
Ontwaken uit OK (sham)	1	05	30min	1x
Ontwaken uit OK (MI)	2a+2b	05	30min	1x
Leven met MI	2a+2b	04	8 dagen	-
Injectie tracers onder narcose en anagesie	1-2a/b	03	5min	1x
MicroSPECT onder anesthesie en analgesie	1-2a/b	03	Max 5 uur	1x
Euthanasie - toestand duur aan einde experiment	1-2a/b	Dood	-	-

10b. Welzijnsevaluatie
De inschatting in 10a is gebaseerd op eerdere experimenten. Bij afwijkende resultaten mbt de evaluatie zal dat op later tijdstip worden gemeld. Eventuele toepassing van pijnbestrijding (9b) en de humane eindpunten (9c) zullen bij deze welzijnsevaluatie in acht worden genomen.

11. Verzorging en huisvesting
De dieren worden verzorgd door CPV medewerker en gehuisvest in de ruimte van het CPV. Tijdens de experimenten (OK: , microSPECT: en bij het wakker worden van de dieren is steeds minimaal een van de onderzoekers aanwezig om toe te zien op de toestand van het dier.

12. Deskundigheid
De betrokkenen zijn allen bevoegd en bewaam voor het uitvoeren van deze experimenten. Met de SOPs is voldoende ervaring opgedaan uit eerdere experimenten.

13. Standard Operation Procedures (SOP)
Zie bijlage sop_05M_mi-muis.doc

Relevante literatuur
Eventueel een kopie bijvoegen.

Art. 12
Art. 12
Art. 12
Art. 12
Art. 09
tel:

SOP

Ongerief 05

Myocardinfarct bij de muis

Narcose :

- **Isofluraan** : inleiden met 3 – 4 % en onderhouden met 1.5 – 2.5 %

  Indien niet mogelijk

- **Xylazine** 2.5 mg/kg s.c. en **Ketamine** 50 mg/kg i.m.

  en onderhouden

- met **Isofluraan** 1.5 – 2.5 %

  of

  Xylazine 5 mg/kg s.c. en **Ketamine** 100 mg/kg i.m.

als de muis goed onder narcose is :

- borstkas scheren en desinfecteren met jodium
- ogen behandelen met oogzalf
- de muis op de rug leggen en fixeren
- tracheatube inbrengen via mond
- de muis aansluiten op de beademingspomp (frekwentie van 210/min en volume 250 µl)
- de narcose nu verder onderhouden met isofluraan
- incisie in de huid maken ter hoogte van de 4^{e} en 5^{e} rib links
- de grote en de kleine borstspier vrijprepareren en m.b.v. haakjes opzij houden
- de borstkas openen door met een pincet een kleine opening te maken in de intercostaalspieren en pleura , ± 2mm lateraal van het sternum . Met een pincet de intercostaalspieren voorzichtig iets optillen en doorknippen. Hierbij goed opletten dat de longen niet geraakt worden.

- een klein steriel gaasje (absorption triangle) vochtig maken met steriel fysiologisch zout en hiermee de longen opzij houden
- het pericard openen
- bekijk de loop van de coronaire arterie onder het binoculair en plaats een ligature (proleen 6 – 0) rond de linker coronaire arterie
- 2 ligaturen (zijde 5 – 0) om de 4^{e} en 5^{e} rib aanbrengen
- gaasje verwijderen en thorax sluiten
- borstspieren losmaken en over de wond terugplaatsen
- tijdens het sluiten van de borstkast een lichte druk uitoefenen om een negatieve druk te krijgen
- de huid hechten met enkelvoudige knoophechtingen (5 – 0 hechtzijde)
- muis bijlaten komen in een verwarmde ruimte met een temperatuur van 30°C

Pijnbestrijding:

Bij **Isofluraan** narcose:

Pre-operatief wordt subcutaan buprenorphine (Temgesic) 0.1 mg/kg (werkingsduur +/- 12 uur) toegediend.

Bij **Ketamine/Xylazine/Isofluraan** narcose:

Post-operatief wordt, als de muis wakker is, subcutaan buprenorphine (Temgesic) 0.1 mg/kg (±12 uur werkzaam) toegediend. Indien nodig wordt de volgende dag (in de morgen en op het einde van de middag) de injectie van buprenorphine herhaald.

University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*MicroSPECT van myocardiale perfusie en celdood na myocardiaal infarct*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de aantallen op het voorblad en bij punt 7c in overeenstemming te brengen.
- 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.
- Bij punt 10a dient het leven met een infarct ook vermeld te worden.
- De DEC verzoekt bij punt 10b alleen de humane eindpunten te vermelden die van toepassing zijn op dit experiment.

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 2011-061, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
6200 MD Maastricht

03-05-2011

Geachte Heer!

Naar aanleiding van uw reactie MQ-230-11 van 3 mei jl op mijn projectaanvraag 2011-061 "MicroSPECT van myocardiale perfusie en celdood na myocardiaal infarct" is de aanvraag aangepast.

- De aantallen op het voorblad en bij punt 7c zijn in overeenstemming gebracht door alle dieren die een myocardiaal infarct krijgen onder één groep (Groep 2) te brengen. Binnen deze Groep 2 krijgen de dieren een single tracer (Groep 2a) of een dual tracer (Groep 2b) toegediend.
- De duur van de proef op het voorblad is gewijzigd van 14 naar 8 dagen
- Bij punt 10a is voor Groepen 2a en 2b het leven met een myocardiaal infarct (ongerief 04) toegevoegd
- De humane eindpunten bij punt 9c zijn aangepast. Tevens is bij 10b vermeld dat eventuele toepassing van pijnbestrijding (9b) en de humane eindpunten (9c) bij de welzijnsevaluatie in acht zullen worden genomen

Ik hoop u hiermee van voldoende informatie te hebben voorzien. Indien er vragen cq. opmerkingen zijn dan verneem ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

Vakgroep

Maastricht University

Faculty of Health, Medicine and Life Sciences

Aan:

Ons kenmerk	*Doorkiesnummer*	*Maastricht*
	043-	03-05-2011

Project: *MicroSPECT van myocardiale perfusie en celdood na myocardiaal infarct.*

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.
De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een positief advies.

Projectnummer:	2011-061
Diersoort:	muis
Aantal dieren:	21
Einddatum:	03-05-2015

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

Vice-Voorzitter DEC-UM

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

Bezoekadres

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht