

20

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie juni 2008

DECNR: 2011-070

Herziene versie

Ontvangen: 22-06-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
23-06-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LVN/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	31962230B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

De rol van de mucusbarrière in het voorkomen van bacteriële translocatie en inflammatie als gevolg van colon ischemie/reperfusie

Startdatum 01-06-2011

einddatum 01-06-2015

Duur van de proef¹⁰: 28 h

	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. Verantwoorde-lijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art. 9	
5.				Art. 9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1	2	3	4			
ctrl/exp/sham	Exp (ontwaakt niet uit anesthesie)	Sham (ontwaakt niet uit anesthesie)	Exp (ontwaakt uit anesthesie)	Sham (ontwaakt uit anesthesie)			
Diersoort	02	02	02	02			
Stam	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley			
Construct / mutatie ?	Nee	Nee	Nee	Nee			
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02			
Aantal	108	28	27	7			
Geslacht	M	M	M	M			
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja			
Leeftijd/gewicht	300-350g	300-350g	300-350g	300-350g			
Doel van de proef *	33	33	33	33			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	01	01	01			
Anesthesie *	04	04	04	04			
Pijnbestrijding *	04	04	04	04			
Mate ongerief *	02	02	04	04			
Toestand dier einde exp ¹	01	01	01	01			

1 Verantwoording

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

Titel: De rol van de mucusbarrière in het voorkomen van bacteriële translocatie en inflammatie als gevolg van colon ischemie/reperfusie

1. Doel van de proef.

Colon ischemie/reperfusie (IR) is een frequent voorkomend fenomeen na grote abdominale en vasculaire operaties en bij inflammatoire darmziekten.¹ Colon-IR kan gepaard gaan met darmbarrièreverlies en systemische inflammatie, en speelt daarom een belangrijke rol in de pathogenese van postoperatieve complicaties, zoals sepsis en multi-orgaanfalen, en kent een hoge morbiditeit en mortaliteit.² De mate en duur van darmischemie zijn belangrijke voorspellers voor de uitkomst van chirurgie en sepsis. Er bestaat tot op heden nog geen effectieve therapie die IR-geïnduceerde complicaties kan voorkomen of verminderen.

Om nieuwe inzichten te verkrijgen in de processen die gepaard gaan met de ontwikkeling van colon IR-geïnduceerde complicaties

bestuderen. (mucus) producerende slijmbekercellen (gobletcellen) in het colon secretoir zeer actief worden, en hun mucus direct in het darmlumen uitstorten.

bestuderen.

Om de gevolgen van de waarnemingen moment twee belangrijke onderzoeksdoelen:

te begrijpen zijn er op dit

1. het bestuderen van de consequenties van colon-IR op de mucusbarrière in het colon in een model voor colon-IR in ratten
2. het bestuderen van de relatie tussen a) duur van colon-IR, b) de mate van schade aan de mucuslaag en c) de bacteriële translocatie en inflammatoire respons hierop

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Colon-IR is een frequent voorkomend fenomeen wat kan leiden tot verstoringen van de darmbarrière, translocatie van bacteriën en systemische inflammatie. Dit zijn belangrijke oorzaken van ernstige postoperatieve en posttraumatische complicaties zoals sepsis en multi-orgaanfalen. Bovendien speelt ischemie in het colon een belangrijke rol bij inflammatoire darmziekten zoals de ziekte van Crohn en Colitis Ulcerosa. Omdat er tot op heden geen geschikte preventieve of therapeutische strategieën zijn, is het belangrijk om meer inzicht te krijgen in de pathofysiologie van colon-IR. Dit kan de ontwikkeling van nieuwe, doelgerichte behandelopties bevorderen.

een belangrijke rol voor de mucusbarrière in het colon voor het tegengaan van bacteriële translocatie. Om toe te werken naar gerichte therapieën, is het belangrijk de gevolgen van de waargenomen fenomenen beter in kaart te brengen, gebruik makend van proefdiermodellen. Deze kennis zal uiteindelijk als basis gebruikt worden voor het ontwikkelen van nieuwe preventie- en behandelstrategieën gericht op het bestrijden van IR-geïnduceerde darmschade in de mens.

3. Alternatieven

Er werd zoveel mogelijk aan vervanging gedaan door het ontwikkelen van een

. Het is echter nog niet mogelijk om de effectieve bijdrage van de pathofysiologische processen bij colon-IR te bestuderen

De weefselschade en inflammatoire respons die ontstaat na colon-IR is een zeer complex fenomeen waarbij de bacteriële flora naar verwachting ook een belangrijke rol speelt. Het is niet mogelijk een

dergelijk fenomeen *in vitro* na te bootsen.

4. Ethische afweging

Het gebruik van proefdieren in deze studie is onvermijdelijk gezien de aard van het te onderzoeken proces. De dieren zullen tijdens ingrepen onder voldoende diepe anesthesie worden gebracht en gepaste pijnstilling toegediend krijgen. Deze studie levert kennis op over het ontstaansmechanisme van schade en inflammatie geïnduceerd door colon-IR. Hierdoor wordt het mogelijk om op gerichte wijze nieuwe interventies te ontwikkelen die een belangrijke bijdrage te kunnen leveren aan het verminderen van de morbiditeit en mortaliteit van chirurgische patiënten.

De positieve gevolgen van interventies die aan de hand van de resultaten van deze proef ontwikkeld kunnen worden wegen ons inziens op tegen het ongerief dat de dieren in deze proef wordt aangedaan.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Colon-IR is een frequent voorkomend fenomeen wat kan leiden tot verstoringen van de darmbarrière, translocatie van bacteriën en systemische inflammatie.¹ Dit zijn belangrijke oorzaken van ernstige postoperatieve en posttraumatische complicaties zoals sepsis en multi-orgaanfalen.² Bovendien speelt ischemie in het colon een belangrijke rol bij inflammatoire darmziekten zoals de ziekte van Crohn en Colitis Ulcerosa.³ Omdat er tot op heden geen geschikte preventieve of therapeutische strategieën zijn, is het belangrijk om meer inzicht te krijgen in de pathofysiologie van colon-IR.

Onderzoek heeft een aantal interessante bevindingen aan het licht gebracht. Ten eerste werd gevonden dat de slijm(mucus)producerende slijmbekercellen (gobletcellen) sterk secretair actief worden tijdens ischemie en reperfusie van het colon, en hun gehele inhoud van mucus-bevattende granules in het lumen uitstorten. Dit heeft tot gevolg dat na 60 minuten reperfusie van het stuk colon dat werd blootgesteld aan ischemie, de gobletcellen weinig granules meer bevatten en het colonepitheel dus niet meer door een nieuwe mucuslaag beschermd kan worden. Een deficiëntie van mucines, de belangrijkste componenten van de mucuslaag in het colon, is een belangrijke oorzaak van darmbarrièreverlies in het colon, waardoor bacteriën kunnen binnendringen en een ontstekingsreactie veroorzaken.^{4, 5}

Endoplasmatisch reticulum (ER) stress geïnitieerd wordt in gobletcellen. Het ER is belangrijk in het verwerken van eiwitten^{6, 7} en we hypothetiseren dan ook dat ER stress in gobletcellen leidt tot een verstoring in de aanmaak van nieuwe mucines, belangrijke eiwitten die de basis vormen voor de mucuslaag. Studies in muizen hebben laten zien dat ER stress in gobletcellen kan leiden tot verminderde en verkeerde aanmaak van mucines, wat een verstoorde mucuslaag tot gevolg heeft.⁸ Hierdoor kunnen bacteriën aan epitheelcellen aanhechten en inflammatie veroorzaken.

Met de huidige kennis over de rol van mucines in het tegengaan van bacteriële translocatie, hypothetiseren we dat

- 1) de mucuslaag verstoord wordt door colon-IR,
- 2) de mucuslaag tijdens reperfusie niet goed hersteld kan worden doordat gobletcellen weinig granules meer bezitten en de aanmaak van nieuwe mucines verstoord is door ER stress, en
- 3) dat verstoring in de mucusbarrière leidt tot bacteriële translocatie en inflammatie.

Deze pathofysiologische mechanismen kunnen niet in de mens onderzocht worden en vormen de basis van de hier voorgestelde dierstudies. De dierexperimenten zullen gefaseerd worden uitgevoerd, waarbij het volgende in overweging wordt genomen:

- 1) colon-IR in de rat moet de pathofysiologische situatie in de mens nabootsen om de beoogde antwoorden te kunnen bieden. Dit zal dus in eerste instantie worden onderzocht. Het colon van de rat zal worden blootgesteld aan 30 en 60 minuten ischemie, met 3 reperfusietijden (0 minuten (geen reperfusie), 30 minuten reperfusie en 120 minuten reperfusie).

Uitgangspunten hierbij zijn dat colon-IR in de rat moet leiden tot een verhoogde mucussecretie tijdens ischemie, en endoplasmatisch reticulum stress tijdens reperfusie:

- 2) Indien colon-IR in de rat representatief is, zal onderzocht worden wat de lange termijn effecten van colon-IR zijn op de mucuslaag in het colon. Om dit te onderzoeken zijn twee reperfusietijden gekozen: a) 240 minuten reperfusie, waarbij beoordeeld wordt of de mucuslaag aan het herstellen is, of dat het herstel verstoord is door ER stress, en b) 24h reperfusie. In eerdere muisstudies naar IR van de dunne darm werd gevonden dat er nog steeds ER stress plaatsvindt na 24h reperfusie. Bij colon-IR in de rat wordt bekeken of dit ook het geval is, en of dit ook leidt tot een verstoorde aanmaak van de mucuslaag.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is op wetenschappelijkheid beoordeeld en goedgekeurd door

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

wordt gebruik gemaakt van Sprague-Dawley ratten met een gewicht tussen 300 en 350 gram.⁷ De ontstekingsrespons die in deze dieren optreedt is uitgebreid gekarakteriseerd. Verschillende technieken zijn beschikbaar om bij deze dieren inflammatie, darmpermeabiliteit, bacteriële translocatie, enterocytintegriteit en tight junction te bestuderen. De leverancier is bij voorkeur Charles River. Er is geen sprake van hergebruik. Alle dieren worden na afloop van het experiment geëuthanaseerd.

7b. Sexe

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke dieren. De belangrijkste reden hiervoor is het feit dat mannelijke en vrouwelijke dieren een verschillende vatbaarheid vertonen voor het ontwikkelen van IR-geïnduceerde schade. Zo kunnen vrouwelijke proefdieren langere ischemische periodes verdragen dan mannelijke proefdieren in modellen voor nier-IR.⁹ Ook zijn vrouwelijke dieren beter beschermd tegen acute myocard-IR-schade.^{10, 11} Deze data suggereren dat er ook verschillen bestaan in de vatbaarheid voor darm-IR-schade. Om een zo stabiel mogelijk model te verkrijgen, en zo het aantal proefdieren te beperken, wordt gekozen voor ratten van hetzelfde geslacht. De afweerrespons bij mannelijke dieren werd al eerder goed gekarakteriseerd; gebruik van beide geslachten zou betekenen dat een groot deel van de in eerdere studies uitgevoerde proeven herhaald zouden moeten worden om vast te stellen of de verkregen resultaten in Sprague Dawley ratten extrapoleerbaar zijn naar vrouwelijke dieren. Mannelijke ratten verdienen bovendien de voorkeur om beïnvloeding door de menstruele cyclus te voorkomen.

7c. Aantallen

Er zijn nog geen data over het optreden van mucusverlies als gevolg van colon-IR en/of ER stress als gevolg van colon-IR. Omdat eerdere studies aangetoond dat 7 dieren per groep voldoende is om een significante stijging van een inflammatoire respons en ER stress (fold change 1.3) aan te tonen ($\delta=30\%$), met een variantie van 20% (σ)⁷, gaan we ervan uit dat dit ook geldt voor colon-IR.

Poweranalyse α : 0.05, π : 0.8, tweezijdige toetsing:

$$n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 * (\sigma/\delta)^2 \text{ (Sachs)}$$

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2 * (20/30)^2$$

$$n = 15.7 * 0.44 = 6.98$$

Uitval:

Peroperatieve en postoperatieve uitval: 15%

Aantal dieren per groep: $N = 7/0.85 = 8.2$ dieren per groep

15 operatie-groepen: $15 * 9 = 135$ ratten

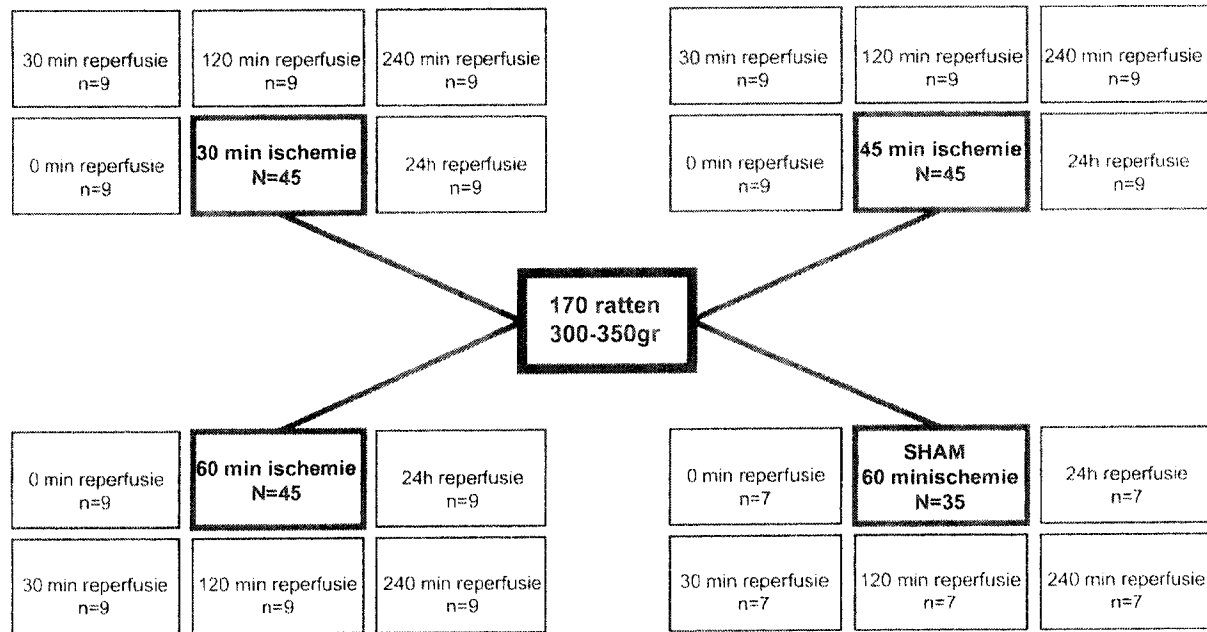
5 shamgroepen zonder uitval: $5 * 7 = 35$ ratten

Totaal: 170 dieren

6 Dierproef

8. Experiment

Voor dit experiment zullen 20 groepen dieren worden gebruikt. Onderstaand schema illustreert de experimentele condities van de verschillende groepen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen ischemie van 30, 45 en 60 min met 5 verschillende reperfusietijden (0 min, 30 min, 120 min, 240 min en 24h. Voor 60 min ischemie groep wordt een sham-geopereerde groep als controle gebruikt, zowel voor ischemie- als voor reperfusiefase. Omdat in deze groep geen uitval wordt verwacht zullen 7 dieren per groep gebruikt worden.



Tijdschema meetdagen (h/min)

Ischemie- en shamgroepen:

Tijd	handeling
-4 h	proefdier nuchter zetten
0 h	anesthesie en pijnstilling (SOP 1), laparotomie en mobilisatie (sham)/afklemmen (ischemie) segmentele bloedvaten (SOP 2)
30/45/60 min	euthanasie (SOP3), darmweefsel en bloed verzamelen

Reperfusie- en shamgroepen:

Tijd	Handeling
-4h	proefdier nuchter zetten
0 h	anesthesie en pijnstilling (SOP 1), laparotomie en mobilisatie (sham)/afklemmen (ischemie) segmentele bloedvaten (SOP 2)
30/45/60 min	klem verwijderen van segmentele bloedvaten, buik afdekken (SOP 2), en bij de 24 h groep buik sluiten (SOP 2) en laten ontwaken
30/120/240 min en 24 h reperfusie	euthanasie (SOP 3), darmweefsel en bloed verzamelen

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Isofluraan-anesthesie wordt toegepast. Isofluraan, inleiden met 3 - 4 % en onderhouden met 2 % tijdens colon-IR (SOP 1).

9b. Pijnbestrijding

30 minuten voor inductieanesthesie met isofluraan wordt Buprenorfine (Temgesic) 0,05-0,1 mg/kg s.c. ingespoten (SOP 1).

Postoperatief: de groep dieren die zal ontwaken (24h reperfusie) zal ten laatste 8h na ontwaken postoperatieve pijnbestrijding krijgen d.m.v. het toedienen van een opiaat (SOP 1).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Euthanasie van de proefdieren wordt verricht middels verbloeding door een vena cava-punctie (SOP 3)

Humane eindpunten:

Bij de groep die uit de anesthesie zal ontwaken en 24h postoperatief zal blijven leven worden de volgende humane eindpunten gedefinieerd:

Algemene klinische verschijnselen:

1. Gedrag (scoren op reactie op prikkels, back arch, twitch, wincing en whrite)
2. Houding
3. Gang/ mobiliteit
4. Verzorgingstoestand
5. faeces
6. andere in het oog springende afwijkingen

Scores: 0= normaal, 1= geringe afwijking, 2= matige afwijking, 3= ernstige afwijking. Bij een score van 3 op een onderdeel of combinatie van scores groter dan 3 zal het dier worden geëuthanaseerd.

10a. Ongerief

Sham en experimentele groepen:

- * Voorbereiding proef: Gering=1
De ratten acclimatiseren 1 week in de proefdiervverblijven.
- * Induceren van colonischemie: Gering/Matig=2
Peroperatief onder anesthesie en pijnstilling
- * Postoperatief met behulp van pijnstilling: Matig/ernstig=4
Maximaal 24 h
- * Euthanasie en weefselverzameling: Gering/matig=2
Terminaal experiment onder anesthesie

De totale tijdsduur van een proef (exclusief acclimatiseren) bedraagt maximaal 29 uur.

Het maximale ongerief voor de dieren die niet zullen ontwaken is Gering/Matig=2.

Het maximale ongerief voor de dieren die wel zullen ontwaken is Matig/Ernstig=4

De hoogste score bepaalt het ongerief. Het ongerief van deze studie is Matig/Ernstig=4

Wat?	Wanneer (t.o.v dag 0)?	Wie?	Ongerief?
Ischemie en sham groepen			
1. Nuchter zetten	0h	VO of VVO	2
2. Anesthesie gevolgd door laparotomie en mobilisatie (sham)/ischemie	4h	VO of VVO	2
3. Euthanasie	4h30/5h	VO of VVO	2
Reperfusie en sham groepen			
1. Nuchter zetten	0h	VO of VVO	2
2. Anesthesie gevolgd door laparotomie en mobilisatie (sham)/ischemie	4h	VO of VVO	2
3. Klem verwijderen (start reperfusie), buik sluiten	4h30/5h	VO of VVO	2
4. 30min reperfusie groep: Onderhoudsanesthesie gevolgd door euthanasie	5h/5h30	VO of VVO	2
120min reperfusie groep: Onderhoudsanesthesie gevolgd door euthanasie	6h30/7h		2
240min reperfusie groep: Onderhoudsanesthesie gevolgd door euthanasie	8h30/9h		2
24h reperfusie groep: Pijnstilling gevolgd door euthanasie	28h30/29h		4

10b. Welzijnsevaluatie

Het welzijn van de ratten wordt dagelijks geïnspecteerd en genoteerd.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren worden sociaal gehuisvest. De dieren worden conventioneel gehuisvest in de kelder van het CPV, de studie vindt in de kelder van het CPV plaats. Het personeel van het CPV houdt toezicht op de dagelijkse verzorging van de proefdieren. Problemen worden direct gemeld aan de verantwoordelijke of de artikel 14 functionaris.

12. Deskundigheid

De VO en de VVO (beiden art. 9-functionaris) hebben beide ruime ervaring met het uitvoeren van dierexperimenten en aanverwante chirurgische handelingen

13. Standard Operating Procedures (SOP)

SOP 1: anesthesie en pijnstilling

SOP 2: laparotomie en IR van het colonsegment

SOP 3: euthanasie

Relevante literatuur

1. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: guidelines on intestinal ischemia. *Gastroenterology* 2000;118:951-3.
2. Baue AE. MOF, MODS, and SIRS: what is in a name or an acronym? *Shock* 2006;26:438-49.
3. Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*;7:281-7.
4. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Buller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006;131:117-29.
5. Bergstrom KS, Kisson-Singh V, Gibson DL, Ma C, Montero M, Sham HP, Ryz N, Huang T, Velcich A, Finlay BB, Chadee K, Vallance BA. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog*;6:e1000902.
6. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:663-74.
7. Grootjans J, Hodin CM, de Haan JJ, Derikx JP, Rouschop KM, Verheyen FK, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA, Lenaerts K. Level of activation of the unfolded protein response correlates with paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion. *Gastroenterology*;140:529-539 e3.
8. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, Thornton DJ, Png CW, Crockford TL, Cornall RJ, Adams R, Kato M, Nelms KA, Hong NA, Florin TH, Goodnow CC, McGuckin MA. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008;5:e54.
9. Hu H, Wang G, Batteux F, Nicco C. Gender differences in the susceptibility to renal ischemia-reperfusion injury in BALB/c mice. *Tohoku J Exp Med* 2009;218:325-9.
10. Ostadal B, Netuka I, Maly J, Besik J, Ostadalova I. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234:1011-9.
11. Lim CC, Bryan NS, Jain M, Garcia-Saura MF, Fernandez BO, Sawyer DB, Handy DE, Loscalzo J, Feelisch M, Liao R. Glutathione peroxidase deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury in male but not female myocardium: insights into antioxidant compensatory mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H2144-53.

Standard Operating Procedures

SOP 1: anesthesie en pijnstilling

Isofluraananesthesie met 30 minuten voor inductie Buprenorfine (Temgesic) eenmalig s.c.

Stockoplossing Temgesic: 0,3mg/ml.

Dosering is 0,05-0,1 mg/kg s.c. (100ul s.c. van de oplossing 0,3mg/ml)

Anesthesie: Isofluraan, inductie met 4 % en onderhouden met 2% gedurende colon-IR.

VO en VVO hebben ervaring met deze technieken

Postoperatieve pijnstilling: de groep ratten die uit de anesthesie zal ontwaken (24h reperfusie-groep) zal postoperatief (ten laatste 8h na ontwaken) een opiaat toegediend krijgen als pijnstilling.

SOP 2: laparotomie, isolatie darmsegment en selectieve occlusie van de aan- en afvoerende vaten van het geïsoleerde colonsegment (ischemie-reperfusie, IR)

Tijdens de operatie wordt de lichaamstemperatuur op 37°C gehouden. Wanneer de rat onder algehele anesthesie is, wordt oogzalf aangebracht bij ratten die zullen ontwaken. De rat wordt geschoren en vervolgens in rugligging gefixeerd op een warmhoudmatje m.b.v. pleister. De huid wordt gedesinfecteerd met iodine en wordt er een midline abdominale incisie gemaakt om toegang te krijgen tot de buikholte.

Ischemie:

Met wattenstaafjes wordt het darmpakket gemobiliseerd en wordt een colonsegment van 8 centimeter geïsoleerd (proximaal colon, direct aangrenzend op het coecum). Beide uiteinden van het geïsoleerde segment worden afgebonden met hechtdraad om bloedvoorziening via collaterale vaten die over het colon lopen uit te sluiten. Vervolgens wordt een microvasculatuur klem geplaatst op de bloedvaten die het stuk colon van bloed voorzien en draineren. Deze klem blijft ter plaatse gedurende 30, 45 of 60 minuten. Het darmpakket wordt zo veel mogelijk intraabdominaal gehouden en met een vochtig gaasje bedekt.

De sham-groep wordt gelijk behandeld, echter er wordt enkel een microvasculatuurklem tegen de vaten gelegd, maar deze worden niet geoccludeerd.

Reperfusie:

De microvasculatuurklem wordt verwijderd en de reperfusieperiode start. Tijdens de reperfusie (30, 120, 240 min) blijven de dieren onder anesthesie en wordt de lichaamstemperatuur op 37°C gehouden.

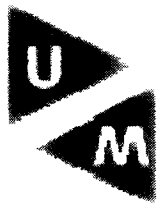
In de groep die 24 h reperfusie ondergaat en dus 24 h postoperatief in leven blijft, wordt allereerst de buikwand en spierlaag, en vervolgens de buikhuid gehecht met monocryl. De lichaamstemperatuur van de dieren worden op 37°C gehouden tot ze goed ontwaakt zijn. Na ontwaken worden deze dieren gehuisvest bij 30°C.

VO en VVO hebben ervaring met vergelijkbare technieken.

SOP 3: euthanasie

Het proefdier wordt onder anesthesie gebracht (SOP 1), de buik wordt geopend en de darmen worden verpakt in natte gaasjes. De rat wordt verbloed door middel van een vena-cavapunctie, waarna het darmweefsel gesampled wordt voor analyse.

VO en VVO hebben ervaring met deze technieken.



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: 043

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 31-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“De rol van de mucusbarrière in het voorkomen van bacteriële translocatie en inflammatie als gevolg van colon ischemie/reperfusie”*, is op de DEC vergadering van 27 mei 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Punt 7c- De DEC is van mening dat de delta en sigma, zoals berekent in cerdere studies, gebruikt moet worden ter berekening voor de huidige groepsgroottes. De DEC deelt mede dat volgens de gangbare wettelijke regels niet naar beneden afgerond mag worden.
- De DEC merkt op dat isofluraan protectief is voor IR bij myocardschade. Kan dit interfereren met deze proef?
- De DEC verzoekt op het voorblad ook de groepen te vermelden die ongerief code 02 hebben. De DEC verzoekt in de toekomst bij punt 10a in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie aan te geven per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven.
- Bij punt 11 verzoekt de DEC te vermelden dat de dieren sociaal gehuisvest worden.

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 2011-070, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan: Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht

Betreft: DEC projectaanvraag 2011-070

Geachte leden van de DEC,

Onlangs beoordeelde de DEC de projectaanvraag: *“De rol van de mucusbarrière in het voorkomen van bacteriële translocatie en inflammatie als gevolg van colon ischemie/reperfusie”*, geregistreerd op nummer 2011-070.

De DEC had een aantal vragen en opmerkingen:

- *Punt 7c- De DEC is van mening dat de delta en sigma, zoals berekent in eerdere studies, gebruikt moet worden ter berekening voor de huidige groepsgroottes. De DEC deelt mede dat volgens de gangbare wettelijke regels niet naar beneden afgerond mag worden. Dit is aangepast en in grijs onderstreept (zie DEC protocol).*
- *De DEC merkt op dat isofluraan protectief is voor IR bij myocardschade. Kan dit interfereren met deze proef? Wij danken de DEC voor haar adviezen. Wij zijn inderdaad op de hoogte van het beschermende effect van isofluraan bij myocardischemie.*
dunne darm ischemie-reperfusie in een rat IR model werd echter ook isofluraan anesthesie gebruikt en werd representatieve darmschade gemeten. Wij verwachten daarom dat de isofluraan niet zal interfereren met de proef. Bovendien hebben wij gemerkt dat er minder uitval is van dieren en dat zij sneller ontwaken uit de anesthesie bij gebruik van isofluraan.
- *De DEC verzoekt op het voorblad ook de groepen te vermelden die ongerief code 02 hebben. De DEC verzoekt in de toekomst bij punt 10a in een tabel, de aard,*



ernst, duur en frequentie aan te geven per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. De aanpassingen op het voorblad zijn doorgevoerd. Ook werd de gevraagde tabel ingevoegd bij punt 10a. De veranderingen zijn grijs gemarkeerd.

- Bij punt 11 verzoekt de DEC te vermelden dat de dieren sociaal gehuisvest worden. Dit is gebeurd, en grijs gemarkeerd in het protocol.*

Bijgevoegd vind u de aangepaste projectaanvraag en het aangepaste voorblad.

Hoogachtend,

From:
Sent: woensdag 22 juni 2011 13:42
To:
Subject: FW: Project 2011-070-w
Attachments: Begeleidende brief DEC 2011_070.doc; DEC_aanvraagformulier 2011_070 (2).doc;
Voorblad DEC 2011_070 (2).doc

Dag

Helaas, deze aanvraag is door de DEC nog niet goedgekeurd.
Het commentaar is het volgende:

De berekening van de groepsgrootte is niet correct: het aantal groepen is vermenigvuldigd met het onafgeronde aantal dieren dat nodig is voor 1 groep (8.2 i.p.v. 9). Aangezien uitvoering van de voorgestelde proeven met een klein aantal dieren kan leiden tot niet conclusieve data verzoekt de DEC dit aan te passen voor de operatiegroepen en het uiteindelijke aantal dieren bij te stellen

Graag je reactie.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616-UNS 50-Box 48, 6200 MD Maastricht
T 043
E-mail:

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

From:
Sent: woensdag 1 juni 2011 18:34
To:
Subject: Project 2011-070-w

Geachte leden van de DEC,

Bijgevoegd treft u de aanpassingen met betrekking tot aanvraag 2011-070 die zijn doorgevoerd naar aanleiding van de opmerkingen in de wijzigingsbrief ontvangen op 31 mei.

Met vriendelijke groeten.

Maastricht University
P.O. Box 616 | 6200 MD Maastricht | the Netherlands
Phone: | Fax: | Mobile:

22-6-2011

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043*Maastricht*
23-06-2011

Project: De rol van de mucusbarrière in het voorkomen van bacteriële translocatie en inflammatie als gevolg van colon ischemie reperfusie

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO)

Secretariaat DEC-UM
T (043)

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**.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-070
Diersoort: rat
Aantal dieren: 170
Einddatum: 23-06-2015

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