

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-105

Versie 2006

Nieuw

Ontvangen: 04-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
15-07-2011	Nieuw

VROM/GCONR ³
06-086

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.			TUE
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	-----

Financieel beheerder

Budgetnummer	(TU/e, BMT) 503220
--------------	--------------------

Titel van het onderzoek:

Kwantificatie van ontstekingsprocessen na ischemie/reperfusie in het muizenhart met behulp van MRI

startdatum 01-08-2011

einddatum ⁹ 01-08-2015Duur van de proef ¹⁰:

4 dagen

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. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷			Art. 9	
4. overige uitvoerenden			Art.12	

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	Expl	Ctrl1	Exp2	Ctrl2			
Diersoort	01	01	01	01			
Stam	C57BL/6	C57BL/6					
Construct / mutatie ?		n.v.t.		n.v.t.			
Herkomst (leverancier) *	01	01/02	01	01/02			
Aantal	20	15	20	15			
Geslacht	m	m	m	m			
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	>25g	>25g	>25g	>25g			
Doel van de proef *	31	31	31	31			
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 *	05	05	05	05			
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01			

1 Verantwoording

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

Titel: Kwantificatie van ontstekingsprocessen na ischemie/reperfusie in het muizenhart met behulp van MRI

1. Doel van de proef.

Het doel van deze studie is de ontwikkeling en validatie van een methode om ontstekingsprocessen na ischemie/reperfusie in het muizenhart *in vivo* te kwantificeren met behulp van Magnetic Resonance Imaging (MRI). In de vakgroep [] in Eindhoven zijn MRI contrastmiddelen ontworpen die specifiek extravaseren en accumuleren in het hartinfarct (DEC 200-036). Er zijn echter ook nieuwe contrastmiddelen ontwikkeld waarbij de samenstelling van het specifieke contrastmiddel is gewijzigd, waardoor deze deeltjes specifiek worden opgenomen door ontstekingscellen (macrofagen en neutrofielen). Deze specifieke contrastmiddelen werden in experimenten gebruikt om ontstekingscellen op verschillende tijdstippen na ischemie/reperfusie in het muizenhart op een niet-invasieve methode te visualiseren (DEC 2009-194). Echter een correlatie tussen het aantal ontstekingscellen en MRI signaal was moeilijk door het gebruik van niet-quantitatieve MRI en de observatie dat de werking van het contrastmiddel beïnvloedt kan worden door fagocytose door ontstekingscellen

In de experimenten beschreven in deze aanvraag, willen wij de correlatie tussen MRI parameters en het aantal ontstekingsprocessen onderzoeken. Om dit te bereiken gebruiken we een commercieel verkrijgbaar contrastmiddel []. Verder is er in onze vakgroep kwantitatieve MRI voor het muizenhart opgezet (zogenaamde T_1 en T_2 mapping protocollen). Met behulp van deze technieken willen we verschillen in de hoeveelheid ontstekingscellen tussen muizen bestuderen door gebruik te maken van []. Deze muizen vertonen een verhoogde ontstekingsreactie na een hartinfarct. Door deze muizen te gebruiken (naast wildtype muizen) kan onderzocht worden of met MRI verschillen in hoeveelheden ontstekingscellen kunnen worden gedetecteerd en gekwantificeerd

In het experiment wordt de correlatie tussen hoeveelheid ontstekingscellen en MRI onderzocht. De muizen ondergaan cardiale ischemie/reperfusie. Vervolgens wordt er drie dagen na de operatie het contrastmiddel geïnjecteerd en zullen de dieren gescand worden met de MRI scanner (tot maximaal 24 uur na injectie). Aan het einde van het experiment worden de dieren opgeofferd en worden de *in vivo* resultaten gecorreleerd aan *ex vivo* MRI en histologie.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



In de gehele wereld is het falen van het cardiovasculaire systeem doodsoorzaak nummer één. Met deze studie willen wij de hoeveelheid en de locatie van ontstekingscellen in het hart na een hartinfarct afbeelden. Als dit mogelijk blijkt, zou een deel van deze nieuwe diagnostiek op de lange termijn in de kliniek kunnen worden toegepast. Hiermee kunnen therapieën (bv. het toedienen van ontstekingsremmers na een hart infarct) op patiënten afgestemd worden.

3. Alternatieven

Het contrastmiddel dat gebruikt wordt in deze studie is eerst *in vitro* op cellijnen getest. Alvorens klinische studies mogelijk zijn, zullen er altijd testen op dieren uitgevoerd moeten worden. MRI is een niet-invasieve techniek die het mogelijk maakt longitudinale studies te doen en als zodanig leidt tot vermindering van het gebruik van proefdieren.

4. Ethische afweging

In dit onderzoek wordt de non-invasieve detectie van ontstekingscellen door middel van een MRI contrastmiddel na een hartinfarct getest. Dit type onderzoek kan alleen in vivo uitgevoerd worden.

Met dit onderzoek zal in de toekomst een gedetailleerder beeld gegeven kunnen worden van de ontstekingsprocessen die plaats vinden na een myocardiaal infarct, en wel op non-invasieve wijze. Hierdoor kan ook het effect van therapie non-invasief bepaald worden.

Voor dit onderzoek ondergaan muizen een ischemie/reperfusie operatie. Hierdoor zullen zij ernstig ongerief ondervinden. Ook zullen zij ongerief ondervinden van het bijkomen uit de anesthesie. Van de MRI-metingen zelf zullen de dieren weinig ongerief ondervinden, omdat dit een non-invasieve techniek is en de dieren onder anesthesie zijn.

Dit onderzoek zou in de toekomst niet alleen kunnen leiden tot een non-invasief onderzoek in de kliniek, maar het zou ook het ongerief van proefdieren en het aantal proefdieren kunnen verminderen. Er vindt nog steeds veel onderzoek plaats naar therapiën ter behandeling van een myocardiaal infarct. Dankzij dit onderzoek zou de werking van deze therapiën op een non-invasieve manier bestudeerd kunnen worden.

Hoewel de proefdieren ernstig ongerief ondervinden van de proef kan dit onderzoek een grote bijdrage leveren aan toekomstig onderzoek naar ischemie en reperfusie in het hart, waardoor de onderzoekers de proef gerechtvaardigd vinden.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Wondheling na een hartinfarct is grofweg verdeeld in vier verschillende fasen: dood van cardiomyocyten, ontstekingsprocessen, vorming van granulatie weefsel en ten slotte de remodelering van granulatieweefsel en vorming van littekenweefsel [1]. Tijdens deze wondheling is de ontstekingsfase van groot belang. Ontstekingscellen, zoals neutrofielen en macrofagen, hebben verschillende functies. Vlak na het hartinfarct verwijderen de ontstekingscellen dood weefsel door middel van fagocytose [1]. In een later stadium veranderen de eigenschappen van macrofagen en brengen zij vascular-endothelial growth factor (VEGF) tot expressie. Dit leidt tot wondheling door accumulatie van myofibroblasten, angiogenese en collageen afzetting [2]. In de literatuur is beschreven dat depletie van neutrofielen na een hartinfarct leidt tot een afname in de microvasculaire permeabiliteit en een afname in infarctgrootte [3]. Daarnaast hebben studies laten zien dat depletie van macrofagen na een hartinfarct leidt tot een verslechterde wondheling en een toename in remodelering en mortaliteit [4].

Uit de literatuur blijkt dus dat ontstekingscellen een belangrijke en multifunctionele rol hebben. Wij zijn geïnteresseerd in het afbeelden van leukocyten (neutrofielen en macrofagen) op een niet-invasieve wijze, waardoor ontstekingsprocessen na een hartinfarct gekarakteriseerd kunnen worden. Dit kan door middel van contrastmiddelen die opgenomen worden door deze leukocyten, zoals

Deze deeltjes zijn gebruikt om infiltratie van leukocyten in infarcten in het muizenhart af te beelden [5]. Echter deze studie bestudeerde alleen kwalitatief de aanwezigheid van leukocyten. In deze studie willen wij kwantitatief de hoeveelheid leukocyten aanwezig in het infarct bepalen.

De worden gevisualiseerd met behulp van MRI. MRI heeft een hoge spatiële en temporele resolutie en kan op een niet-invasieve wijze ziekteprocessen visualiseren en monitoren. De vakgroep in Eindhoven heeft veel ervaring met *in vivo* MRI van het muizenhart [6,7]. Doordat MRI een niet-invasieve afbeeldingstechniek is, kunnen longitudinale studies worden uitgevoerd. En natuurlijk zijn niet-invasieve *in vivo* metingen makkelijker te transleren naar en toe te passen in de kliniek. Tevens is het mogelijk om deze methode te combineren met andere MRI technieken om schade aan het hart te karakteriseren (bijvoorbeeld door niet-invasieve functiemetingen van het hart). In de laatste jaren zijn ook MRI technieken ontwikkeld waarmee de hoeveelheid contrastmiddel in het muizenhart kwantitatief bepaald kan worden: de zogenaamde T1 en T2 mapping [8,9].

In deze studie willen we onderzoeken of met behulp van deze kwantitatieve MRI methodes verschillen in inflammatoire toestand gedetecteerd en gekwantificeerd kunnen worden. Hiervoor worden twee verschillende knockout modellen vergeleken met wildtype muizen.

Het eerste model is een . Van deze muizen is bekend dat hemolyse een grotere oxidatieve schade aanricht en dat nier weefsel vervolgens niet geregenereerd of gerepareerd werd [10]. Tevens hebben studies bij de in Utrecht uitgewezen dat er na een hartinfarct een verhoogde ontstekingsreactie is, die werd gevolgd door intramurale bloedingen.

Het tweede knockout model is een muis waarin de . Na een hartinfarct ontstaat er bij deze muizen een sterkere remodelering van de hartwand, veroorzaakt door onder andere een hogere ontstekingsreactie [11].

Op dit moment zijn er nog geen klinisch toegepaste MRI methodes om lokaal ontstekingsprocessen te kwantificeren. Indien kwantificatie van de in deze studie kan worden aangetoond, is er een nieuwe niet-invasieve methode voorhanden om ontstekingsprocessen na een hartinfarct te

detecteren die wellicht ook klinisch toepasbaar is.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het onderhavige project wordt gefinancierd vanuit het

Dit project heeft als doel het ontwikkelen en toepassen van contrastmiddelen ter verbetering van de diagnostische waarde van MRI bij hartinfarcten. Het hier voorgesteld onderzoek naar afbeelding van ontstekingscellen past binnen dit project. Dit onderzoek is gelezen en goedgekeurd door de co-promotor (1

het 1 oject is beoordeeld en toegekend door NWO/STW, op basis van een wetenschappelijke beoordeling door diverse wetenschappelijke experts.

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species en stam: C57BL/6 muis: wildtype (+/+) en (-/-). De muis heeft een verhoogde inflammatoire status, die resulteert in intramurale bloedingen door de zeer grote aanwezigheid van macrofagen in het infarct weefsel. muis: wildtype (+/+) en (-/-). De muis heeft ook een verhoogde inflammatoire status na een hartinfarct, maar geen intramurale bloedingen.

Herkomst: Knockout dieren voor experimentele groepen zullen geleverd worden door het Utrecht. Wildtype controle dieren worden besteld bij .

Uiteindelijke bestemming: De muizen worden opgeofferd door cervicale dislocatie. Vervolgens zullen organen, zoals hart, longen, spieren, lever, nieren, bot/beenmerg en milt uitgenomen worden voor ex vivo MRI-metingen en/of voor histologische analyse.

7b. Sexe

Er is voor gekozen om alleen mannelijke muizen te gebruiken, omdat uit eerdere onderzoeken gebleken is dat deze minder uitval vertonen. Verder blijkt uit recente literatuur een duidelijk geslachtsverschil in de infarcthealing [1].

7c. Aantallen

In dit experiment worden er op twee tijdstippen muizen opgeofferd: na de eerste maal MRI (~2.5 uur na contrast injectie) of na de tweede maal MRI (~24 uur na contrast injectie).

Voor muizen die opgeofferd worden na 24 uur na de injectie van ijzeroxides, kijken we met MRI naar de afname van signaal in het hart. We verwachten dat de signaalverandering ($= \delta$) ongeveer 30% bedraagt en dat de spreiding ongeveer 20% groot zal zijn.

Invullen van formule van L. Sachs levert dan op: $n = 15,7 * (20/30)^2 = 6,978$

Voor het berekenen van de groepsgrootte moet er echter nog rekening gehouden worden met de uitval. De verwachte uitval door de ischemie/reperfusie operatie en de periode hierna voor de knock-out muizen is groot (50%) en voor de wildtype dieren is dit 30%. De groepsgrootte kan nu als volgt berekend worden:

Voor knock-out muizen:

$$(a - 0,5 * a) = 6,978 \text{ en dus } 0,5 * a = 6,978$$

$$a = 13,956 \rightarrow 14 \text{ muizen per groep}$$

Voor wildtype muizen:

$$(a - 0,3 * a) = 6,978 \text{ en dus } 0,7 * a = 6,978$$

$$a = 9,968 \rightarrow 10 \text{ muizen per groep}$$

Om met histologie vast te kunnen stellen waar het contrastmiddel zich bevindt na de eerste MRI meting (dus 2.5 uur na contrast injectie), verwachten we 3 muizen nodig te hebben. Rekening houdend met uitval door de ischemie/reperfusie operatie en de periode hierna betekent dit:

Voor knock-out muizen:

$$(a - 0,5 * a) = 3 \text{ en dus } 0,5 * a = 3$$

$$a = 6 \rightarrow 6 \text{ muizen per groep}$$

Voor wildtype muizen:

$$(a - 0,3 * a) = 3 \text{ en dus } 0,7 * a = 3$$

$$a = 4,286 \rightarrow 5 \text{ muizen per groep}$$

In deze studie wordt twee maal hetzelfde experiment uitgevoerd, maar dan op twee verschillende knock-out muismodellen). In ieder experiment zijn twee groepen muizen aanwezig: knock-out met ischemie/reperfusie operatie en wildtype met ischemie/reperfusie operatie. In totaal zijn er dus 2 groepen knock-out muizen nodig en 2 groepen wildtype muizen.

Totaal aantal dieren: $2*(14+6)+2*(10+5)=70$ muizen

7 Dierproef

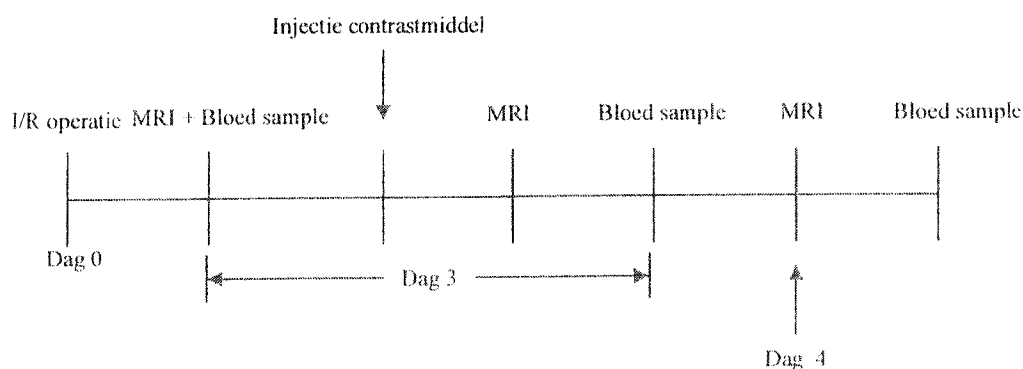
8. Experiment

Experimentele groepen:

studie			
Exp1	Ctrl1	Exp2	Ctrl2
(-/-) met ischemie/ reperfusie	Wildtype (+/+) met ischemie/ reperfusie	(-/-) met ischemie/ reperfusie	Wildtype (+/+) met ischemie/ reperfusie
n=14+6	n=10+5	n=14+6	n=10+5

Experiment:

Het doel van dit experiment is om de hoeveelheid en de locatie van ontstekingscellen te bepalen na een hartinfarct in muizen met een wildtype muizen en muizen met een verhoogde inflammatoire status (knockout muizen). De muizen ondergaan een ischemie/reperfusie operatie (zie SOP1). Vervolgens verblijven de dieren overnacht in de recovery kamer bij 30°C. Op dag 3 na de ischemie/reperfusie operatie worden de dieren onder anesthesie gebracht en een katheter wordt in de staartvene aangebracht om contrastmiddel te injecteren (zie SOP2). Tevens wordt een bloed sample via de vena saphena afgenomen (pre contrast injectie). De muis blijft onder anesthesie en wordt vervolgens in de MRI scanner gepositioneerd (zie SOP3). Er worden MRI metingen uitgevoerd voor de injectie van het contrastmiddel, vervolgens wordt het contrastmiddel ingespoten en er worden post-contrast injectie metingen uitgevoerd. Na de MRI metingen wordt de muis uit de MRI scanner gehaald en wordt een bloedsample afgenomen (post contrast injectie). Een deel van de muizen wordt vervolgens opgeofferd door middel van cervicale dislocatie. De organen worden uitgenomen en ingevroren voor histologie en/of *ex vivo* MRI. Voor de rest van de muizen worden de MRI metingen 24 uur later nogmaals uitgevoerd en de bloedafname wordt ook herhaald. Vervolgens worden deze muizen opgeofferd door middel van cervicale dislocatie. Organen worden uitgenomen en ingevroren voor histologie en/of *ex vivo* MRI.



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voorafgaand aan de ischemie/reperfusie operatie worden de muizen geïntubeerd, na isofluraan inductie, en onder anesthesie gehouden met 2-3% isofluraan. Tijdens de MRI scans (inclusief inbrengen infuus) en de euthanasie wordt algehele anesthesie toegepast met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie 3-4%, onderhoud 1-2%). Het anestheticum wordt toegediend via een mondkapje met medische lucht en/of O₂ als dragergas. De diepte van de anesthesie wordt

steeds gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex;

9b. Pijnbestrijding

Preoperatief wordt s.c. buprenorphine (Temgesic) 0.1mg/kg toegediend, 30min voor aanvang van de ischemie/reperfusie operatie. Postoperatief wordt de injectie van buprenorphine tot **minimaal 2 dagen na de operatie** herhaald (0.05-0.1mg/kg). Hierbij wordt er rekening gehouden met het feit dat de tijd tussen twee injecties 8-12 uur is, aangezien de werkingsduur van Temgesic 8-12 uur is.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De dieren ontwaken na de laatste MRI metingen niet meer uit de anesthesie en worden opgeofferd middels cervicale dislocatie.
- Na de operatie wordt iedere dag de volgende scoringslijst bijgehouden:
 - Post-operatieve gewichtsafname: normaal = 0, >10% = 1, >15% = 2, >20% = 3
 - Beweging: normaal = 0, ongecoördineerd = 1, stil/niet bewegen = 2, (gedeeltelijke) verlamming = 3
 - Ademhaling: normaal = 0, versneld = 1, pompend = 2, pendelend = 3
 - Vacht/huid conditie: normaal = 0, rechtopstaande vacht = 1, wondjes/schilfers/porfyrie neus/ogen = 2, geïnfecteerde wond = 3

Humane eindpunten, waarbij het dier wordt geëuthanaseerd, zijn:

1. Als de totale score tijdens één observatie 6 of hoger is
2. Als één van de ziektekenmerken een score 3 geeft

De (vervanger) verantwoordelijke onderzoeker en CPV medewerkers UM (bij de Technische Universiteit Eindhoven) zullen toezicht houden op de dieren.

10a. Ongerief



Alle dieren ondergaan dezelfde handelingen en dus dezelfde mate van ongerief. De volgende experimentele handelingen zullen mogelijk ongerief met zich meebrengen:

- Ischemie/reperfusie operatie: ernstig ongerief (05).
- Aanbrengen van infuus, afnemen van bloedsamples (2x) en MRI: deze handelingen vinden onder anesthesie plaats en de MRI metingen duren maximaal 4 uur; matig ongerief (02).
- Enkele dieren ontwaken na MRI uit anesthesie en ondergaan 24h later opnieuw MRI en er wordt nogmaals een bloedsample afgenomen: matig ongerief (02).
- Opofferen middels cervicale dislocatie: vindt ook onder anesthesie plaats; matig ongerief (02).

Het totale ongerief wordt daarmee gekwantificeerd als ernstig (05).

11. Verzorging en huisvesting

In verband met overkomst vanuit een ander laboratorium van de knockout muizen (experimentele groepen 1 en 2, , Utrecht) vindt huisvesting in Eindhoven plaats onder filtertop en wordt de verzorging geïsoleerd uitgevoerd, nadat eerst overige dieren zijn verzorgd. Contact met overige dieren wordt op deze manier geminimaliseerd (zie ook SOP4). Wildtype muizen (controle groepen 1 en 2) worden op de standaard manier gehuisvest, zonder filtertop.

De dieren worden sociaal gehuisvest, hebben kooiverrijking en ad libitum toegang tot water en voer. De huisvesting en verzorging vinden plaats in het dierenverblijf van de Technische Universiteit Eindhoven.

Bestellingen en het transport van de knockout dieren wordt in overleg met de transportcoördinator en de art. 14 functionaris van het CPV geregeld.

De ischemie/reperfusie operaties zullen plaatsvinden in de proefdierruimte van de . Na de operatie verblijven de dieren overnacht bij 30°C.

Voor de zorg gedurende het experiment zullen wij zorgdragen. Na de ischemie/reperfusie operatie zullen de dieren, indien nodig, solitair gehuisvest worden. Bij calamiteiten dienen de VO of VVO (beiden art. 9) of een medewerker van het CPV aan de Technische Universiteit Eindhoven (art. 12) gewaarschuwd te worden.

12. Deskundigheid

Alle handelingen worden uitgevoerd door de VO en VVO (beiden art. 9) en zij zullen worden geassisteerd door een medewerker van het CPV aan de Technische Universiteit Eindhoven (art.12).

13. Standard Operation Procedures (SOP)

SOP1: Ischemie/reperfusie bij de muis

SOPnr 7 -TUE Ischemie-Reperfusie muis.

SOP2: Inbrengen van infuus voor toedienen van contrastmiddel

De muizen zullen voor de experimenten de volgende handelingen ondergaan:

- * Sedatie met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie in inductiebox: 3-4%; onderhoud met behulp van mondkapje: 1-2%). Met behulp van medische lucht en/of O₂ als dragergas. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex;
- * Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de muis gepositioneerd wordt, onder voortdurende bewaking van de ademhalingfrequentie.

- De staartvene zal worden aangeprikt en een infuusslangetje en spuit met het contrast middel wordt aangesloten.

SOP3: Protocol MRI scans

Anaesthesie:

- Algehele anaesthesie met behulp van inhalatie anaesthesie ; medische lucht en/of O₂ (0.4 l/min) met isofluraan (inductie in inductiebox: 3-4%; onderhoud met behulp van mondkapje: 1-2%). Indien contrastmiddel wordt ingespoten, zijn dieren nog steeds onder anesthesie door SOP2.

Preparatie en positionering:

- De muis wordt in de opstelling gelegd, waarin een warmhoudmatje en de anaesthesietoevoer via mondkapje zijn bevestigd. Oogzalf wordt aangebracht.
- Met een pincet worden de voorpoten in de gel, welke op de ECG-elektroden is aangebracht, gedrukt.
- De voorpoten worden met een klein stukje plakband aan de ECG-elektroden bevestigd.
- De achterpoten worden gefixeerd en een klein ballonnetje wordt op de onderbuik gedrukt voor het respiratoire signaal.
- De opstelling wordt in de scanner geschoven.
- Indien contrastmiddel wordt geïnjecteerd, dan wordt het MRI contrastmiddel via het infuusslangetje in de staartvene ingespoten

Scannen:

- De MRI scanner wordt ingesteld. Vervolgens wordt er maximaal 4 uur gescand. MRI scans vinden plaats in de MRI ruimte () van de van de TUE). Afhankelijk van de experimenten ontwaken de dieren in een recovery bak (30°C) of worden de dieren opgeofferd door cervicale dislocatie.

SOP4: aankomst en verzorging externe dieren

- Aankomst dieren volgens procedure beschreven in 'import van knaagdieren van niet commerciële fokbedrijven'
- Muizen worden in flowkast geplaatst in ruimte (VVO)
- Muizen worden in flowkast gewogen, gecontroleerd en vervolgens in een filtertop macrolon kooi geplaatst (VVO)
- Nadat de filtertop op de kooi is geplaatst, wordt de buitenzijde van de kooi schoongemaakt met Neoform (VVO)
- Aan de kooi wordt een label gehangen, waarop staat dat de filtertop niet geopend mag worden en indien nodig de VVO wordt gecontacteerd (VVO)
- Vervolgens wordt de kooi in het dierverblijf geplaatst op de onderste rij om eventueel besmettingsgevaar voor andere dieren te minimaliseren (VVO)
- De flowkast en weegschaal worden schoongemaakt met Neoform (VVO)
- De dieren worden dagelijks visueel gecontroleerd. Indien het nodig is om de dieren uit de kooi te halen, dient dit in de flowkast te gebeuren na contacteren van de VVO en moet de kooi hierna aan de buitenzijde worden afgenomen met Neoform (medewerker CPV)
- De macrolon kooien worden geïsoleerd verschoond, nadat alle andere kooien verschoond zijn.
- Na de experimenten worden alle gebruikte materialen en werkplekken met Neoform gereinigd (VVO)
- De macrolon kooien worden in de flowkast geplaatst en bedding uit de kooi wordt

geïsoleerd in een afgesloten plastic zak en wordt hier bewaard tot aan het einde van de experiment series of het einde van de week (VVO/medewerker CPV)

- De plastic zak met bedding wordt afgesprayd met Neoform en wordt volgens standaard protocol afgevoerd aan het einde van de dag, om zo contact met de overige dieren te minimaliseren (medewerker CPV)
- De lege filtertop kooien worden gereinigd met Neoform en blijven in de flowkast tot aan het einde van de dag. Na het reinigen van de overige kooien, worden deze kooien schoongemaakt volgens standaard procedure (medewerker CPV)

Relevante literatuur

- [1] Blankesteijn, W.M., et al., *Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice*. Acta Physiol Scand, 2001. 173(1): p. 75-82.
- [2] Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. 204(12): p. 3037-47.
- [3] Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1999. 43(4): p. 860-78.
- [4] van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. Am J Pathol, 2007. 170(3): p. 818-29.
- [5] Yang, Y., et al., *Temporal and noninvasive monitoring of inflammatory-cell infiltration to myocardial infarction sites using micrometer-sized iron oxide particles*. Magn Reson Med, 2010. 64(1): p. 33-40.
- [6] Heijman, E., et al., *Comparison between prospective and retrospective triggering for mouse cardiac MRI*. NMR Biomed, 2007. 20(4): p. 439-47.
- [7] Heijman, E., et al., *Magnetic resonance imaging of regional cardiac function in the mouse*. MAGMA, 2004. 17(3-6): p. 170-8.
- [8] Coolen, B.F., et al., *Three-dimensional T1 mapping of the mouse heart using variable flip angle steady-state MR imaging*. NMR Biomed, 2011. 24(2): p. 154-162.
- [9] Coolen B.F., et al., *T2 mapping of the mouse heart using segmented MLEV supercycle preparation*. Proceedings ISMRM 2011
- [10] Lim, B.S., et al., *Increased susceptibility in Hp Knockout mice during acute hemolysis*. Blood, 1998. 92: p. 1870-1877.
- [11] Timmers, L., et al., *Targeted deletion of nuclear factor κ B p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction*. Circ Res, 2009. 104: p. 699-706.

Sop

Postbus 513, 5600 MB Eindhoven

Ischemie/reperfusie (muis)

30 juli 2010

Contact

Werk A-septisch !

Anesthesie ; (zorg voor efficiënte afzuiging)

Dragergas:

0,4 l/min Medische Lucht (of combinatie 0,4 l/min ML/O₂ 1:1)

Isofluraan; inleiden met 3 – 4 % in inductiekooitje en onderhouden met 1.5 – 2.5 %.

Muis intuberen en aansluiten op de beademingspomp (frequentie van 210/min en volume 250 µl).

De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van ooglid- en tussenteenreflex.

Preparatie ;

Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat.

De ogen worden bevochtigd met oogzalf.

Thorax scheren en desinfecteren met jodium.

De muis in juiste positie leggen en fixeren.

Incisie in de huid maken ter hoogte van de 4^e en 5^e rib links.

De grote en de kleine borstspier vrij prepareren en m.b.v. haakjes opzij houden.

De thorax openen door met een pincet een kleine opening te maken in de intercostaalspiers en pleura, ± 2mm lateraal van het sternum.

Met een pincet de intercostaalspiers voorzichtig iets optillen en doorknippen. Hierbij goed opletten dat de longen niet geraakt worden.

Een klein steriel spongostan (absorption triangle) vochtig maken met steriel fysiologisch zout en hiermee de longen opzij houden.

Het pericard openen.

Bekijk de loop van de coronair arterie onder de operatiemicroscoop en plaats een ligatuur (proleen 6 – 0) rond de linker coronair arterie en trek deze aan rond een stukje tubing om een bepaalde tijd van ischemie te induceren.

Na de ischemieperiode wordt de ligatuur weer losgemaakt en volgt een periode van reperfusie.

Stukje tubing verwijderen.

2 ligaturen (zijde 5 – 0) om de 4^e en 5^e rib aanbrengen.

Spongostan verwijderen en thorax sluiten.

Borstspieren losmaken en over de wond terugplaatsen.

Datum
30 juli 2010

Pagina
2 van 2

Tijdens het sluiten van de borstkast een lichte druk uitoefenen om een negatieve druk binnen de thorax te krijgen.

De huid hechten met enkelvoudige knoophechtingen (resorbeerbaar synthetisch hechtmateriaal).

Muis bij laten komen in een verwarmde ruimte met een temperatuur van 30°C (recoverychamber)

Pijnbestrijding ;

Pre-operatief wordt subcutaan buprenorphine (Temgesic) 0.05 mg/kg (werkingsduur +/- 12 uur) toegediend.

Post-operatief de injectie van buprenorphine herhaald tot minimaal 2 dagen na de operatie.



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
18-07-2011

Project: Kwantificatie van ontstekingsprocessen na ischemie/reperfusie in het muizenhart met behulp van MRI.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, 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.

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-105

Diersoort: muis

Aantal dieren: 70

Binddatum: 15-07-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM