

# Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

versie feb. 2010

Herziene versie

DECNR: 2011-110

Ontvangen: 02-09-2011

| DEC datum goedkeuring# | Type aanvraag <sub>2</sub>  |
|------------------------|-----------------------------|
| 05-09-2011             | Nieuw / Herz.versie / Pilot |

| VROM/GGONR <sup>3</sup> |
|-------------------------|
|                         |

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

| 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 | 30981118N |
|--------------|-----------|
|--------------|-----------|

Titel van het onderzoek: Real-time imaging van apoptose in een xenograft tumor model.

startdatum 1 september 2011 einddatum<sup>9</sup> 1 september 2015

Duur van de proef<sup>10</sup>: 6 weken (afh van tumorgroei)

| 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> |                                       |             |                          |                      |
| 4. overige uitvoerenden                              |                                       |             | Art. 12 <sup>8</sup>     |                      |
| 5. Overige (PI)                                      |                                       |             | Art. 9                   |                      |

| Diergroep                | 1                   | 2                    | 3                    | 4                  | 5                  | 6                    | 7                    |
|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| ctrl/exp/sham            | M1234-anxA5 (36kDa) | M1234-anxA5 (36 kDa) | M1234-anxA5 (36 kDa) | Cys-anxA5 (36 kDa) | Cys-anxA5 (36 kDa) | M1234-anxA5 (36 kDa) | M1234-anxA5 (36 kDa) |
| Diersoort                | 01                  | 01                   | 01                   | 01                 | 01                 | 01                   | 01                   |
| Stam                     | Nmri-nu             | Nmri-nu              | Nmri-nu              | Nmri-nu            | Nmri-nu            | Nmri-nu              | Nmri-nu              |
| Construct / mutatie ?    | nee                 | nee                  | nee                  | nee                | nee                | nee                  | nee                  |
| Herkomst (leverancier) * | 01                  | 01                   | 01                   | 01                 | 01                 | 01                   | 01                   |
| Aantal                   | 7                   | 7                    | 3                    | 5                  | 5                  | 5                    | 5                    |
| Geslacht                 | m/v                 | m/v                  | m/v                  | m/v                | m/v                | m/v                  | m/v                  |
| Dieren immuuncompetent ? | nee <sup>8</sup>    | nee <sup>8</sup>     | nee <sup>8</sup>     | nee <sup>8</sup>   | nee <sup>8</sup>   | nee <sup>8</sup>     | nee <sup>8</sup>     |
| Leeftijd/gewicht         | 20-25g<br>8 weken   | 20-25g<br>8 weken    | 20-25g<br>8 weken    | 20-25g<br>8 weken  | 20-25g<br>8 weken  | 20-25g<br>8 weken    | 20-25g<br>8 weken    |
| Doel van de proef *      | 30                  | 30                   | 30                   | 30                 | 30                 | 30                   | 30                   |
| Belang van de proef *    | 01                  | 01                   | 01                   | 01                 | 01                 | 01                   | 01                   |

|                           |                           |                           |                             |                             |    |    |    |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----|----|----|
| Toxicologisch onderzoek * | 01                        | 01                        | 01                          | 01                          | 01 | 01 | 01 |
| Bijzondere technieken *   | 01                        | 01                        | 01                          | 01                          | 01 | 01 | 01 |
| Anesthesie *              | 04                        | 04                        | 01                          | 04                          | 04 | 04 | 04 |
| Pijnbestrijding *         | 01                        | 04                        | 01                          | 01                          | 04 | 01 | 04 |
| Mate ongerief *           | 03                        | 04                        | 03                          | 03                          | 04 | 03 | 04 |
| Toestand dier einde exp*  | 01                        | 01                        | 01                          | 01                          | 01 | 01 | 01 |
|                           |                           |                           |                             |                             |    |    |    |
|                           |                           |                           |                             |                             |    |    |    |
| <b>Diergroep</b>          | <b>8</b>                  | <b>9</b>                  | <b>10</b>                   | <b>11</b>                   |    |    |    |
| ctrl/exp/sham             | Cys-Strep-anxA5 (200 kDa) | Cys-Strep-anxA5 (200 kDa) | M1234-Strep-anxA5 (200 kDa) | M1234-Strep-anxA5 (200 kDa) |    |    |    |
| Diersoort                 | 01                        | 01                        | 01                          | 01                          |    |    |    |
| Stam                      | Nmri-nu                   | Nmri-nu                   | Nmri-nu                     | Nmri-nu                     |    |    |    |
| Construct / mutatie ?     | nee                       | nee                       | nee                         | nee                         |    |    |    |
| Herkomst (leverancier) *  | 01                        | 01                        | 01                          | 01                          |    |    |    |
| Aantal                    | 5                         | 5                         | 5                           | 5                           |    |    |    |
| Geslacht                  | m/v                       | m/v                       | m/v                         | m/v                         |    |    |    |
| Dieren immuuncompetent ?  | nee <sup>8</sup>          | nee <sup>8</sup>          | nee <sup>8</sup>            | nee <sup>8</sup>            |    |    |    |
| Leeftijd/gewicht          | 20-25g<br>8 weken         | 20-25g<br>8 weken         | 20-25g<br>8 weken           | 20-25g<br>8 weken           |    |    |    |
| Doel van de proef *       | 30                        | 30                        | 30                          | 30                          |    |    |    |
| 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 *         | 01                        | 04                        | 01                          | 04                          |    |    |    |
| Mate ongerief *           | 03                        | 04                        | 03                          | 04                          |    |    |    |
| Toestand dier einde exp*  | 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:** Real-time imaging van apoptose in een xenograft tumor model.

## 1. Doel van de proef.

Het **doel** van dit onderzoek is het vinden van de variant van fluorescent gelabeld annexin A5 die optimaal is voor real-time non-invasieve optical imaging (Explore Optix MX2 system) van celdood met de Near Infrared probe AF682.

Apoptose (geprogrammeerde celdood) speelt een belangrijke rol in kanker en cardiovasculair gerelateerde complicaties zoals een hart-en herseninfarct. Apoptotische cellen hebben al bewezen een goede biomarker te zijn voor diagnose van kanker en atherosclerosis [1,2] en het monitoren van de effectiviteit van therapieën. Door real-time imaging van apoptotische cellen kan er meer kennis vergaard worden over de ziekte processen en het bestuderen van potentiële behandelingen.

**Inkadering:** De huidige aanvraag komt voort uit de onderzoekslijn rond vasculaire aspecten van Hoofdlijn 1 binnen CARIM en stoelt op ruime ervaring van de aanvrager en diens groep. Het onderzoek zal kennis geven over de mogelijkheden van real-time optical imaging met betrekking tot het gebruik van fluorescent gelabeld annexin A5. Verder is dit onderzoek bedoeld om inzicht te krijgen in het ontstaan en volgen van de behandeling van vasculaire en oncologische ziekten.

**Opzet:** In dit onderzoek zal gebruik gemaakt worden van Nu/Nu muizen. Deze muizen krijgen een normaal dieet (ad libitum). Twee groepen muizen krijgen allereerst een tumor in de rechter flank (subcutane injectie tumor cellen). Als de tumor een grootte heeft bereikt van ongeveer 250 mm<sup>3</sup> (~3 weken) wordt 1 van beide groepen behandeld met cyclofosfamide (intraperitoneaal inspuiten). De volgende dag wordt bij beide groepen M1234-anxA5-AF682 ingespoten via de staartvene (2.5 mg/kg) waarna de muizen herhaaldelijk in de Explore Optix MX2 worden gemeten om de tumor opname en retentie te bepalen. Bij een derde groep wordt M1234-anxA5-AF682 geïnjecteerd waarna op 8 tijdstippen bloed wordt afgenomen via de vena saphena om vervolgens mbv de Explore Optix de M1234-anxA5-AF682 concentratie in het bloed te bepalen. Verder krijgen voor immunohistochemie muizen een subcutane tumor waarna na 3 weken M1234, M1234-Strep, Cys en Cys-strep wordt geïnjecteerd met en zonder cyclofosfamide behandeling. De muizen worden opgeofferd op het tijdstip van maximale tumor opname (1 uur na injectie voor M1234 +/- cyclofosfamide en Cys +/- cyclofosfamide en 24 uur na injectie voor de varianten Cys-Strep +/- cyclofosfamide en M1234-Strep +/- cyclofosfamide). Deze muizen worden voor opofferen 1 maal gemeten in de Explore Optix.

## 2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Dit onderzoek dient om inzicht te krijgen in het celdood proces dmv in vivo niet-invasief meten en om de in vivo effectiviteit van pharmaca te bepalen. D.m.v. real-time imaging met behulp van fluorescent annexin A5 kan het apoptose proces actief gevolgd alswel de response van weefsel op pharmaca.

De resultaten die uit deze studie verkregen worden zullen de kennis vergroten over het ontstaan en de behandeling van oncologische en vasculaire ziekten.

**3. Alternatieven**

Omdat in vivo gemeten moet worden zijn er geen alternatieven voor het gebruik van proefdieren. Het proces van apoptose in een tumor model is dusdanig complex dat er geen in vitro model voor handen is.

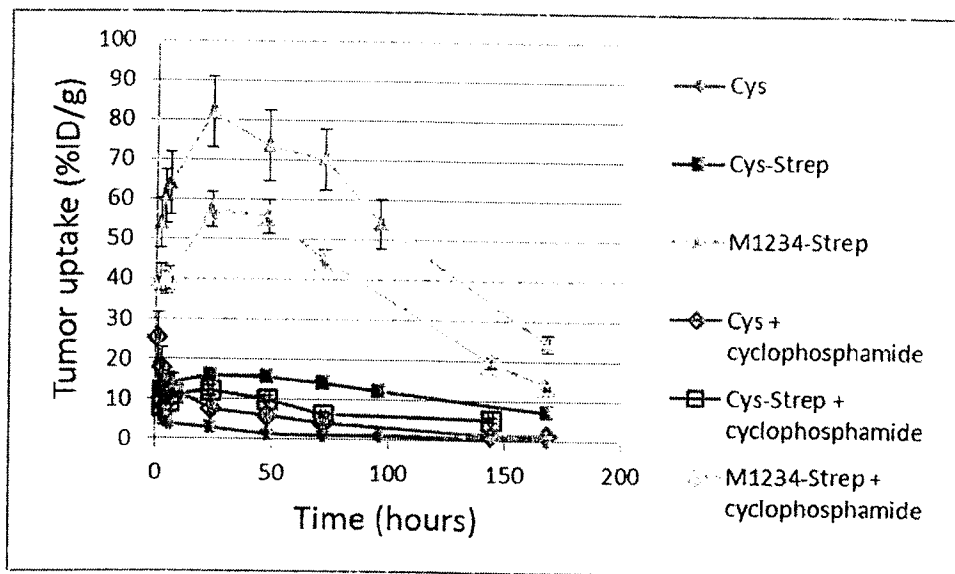
**4. Ethische afweging**

Cardiovasculair lijden en kanker zijn de twee belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld. Volgens de European Public Health Alliance (EPHA) zijn twee-derde van de doodsoorzaken in Europa cardiovasculair of kanker gerelateerd. Hart- en herseninfarcten zorgen voor 41% van alle doodsoorzaken in Europa en kanker is verantwoordelijk voor 25% van alle doodsoorzaken. Het belang van deze proef – inzicht verkrijgen in de diagnostiek en behandeling van kanker – rechtvaardigt ons inzien het ingeschatte ongerief van de proefdieren.

### 5. Wetenschappelijke onderbouwing

Annexine-A5 is een eiwit met hoge affiniteit voor fosfatidylserine (PS), een fosfolipide dat op de buitenzijde van de celmembraan tot expressie komt in cellen die apoptotische celdood ondergaan [1]. De binding van annexine-A5 is geassocieerd met de activatie van caspase-3, een apoptose-inducerend eiwit van het celdoodprogramma. Annexine-A5 kan zodoende als diagnostische methode dienst doen voor het opsporen van celdood. Met name bij een hartinfarct, aderverkalking en kanker kan de hoeveelheid celdood in aangedane organen een voorspellende waarde hebben voor het verloop van de ziekte en de effectiviteit van een behandeling. Targeting functie en biodistributie van annexin A5 spelen een cruciale rol in de toepassingen van annexin A5 als een moleculaire imaging probe.

In eerder onderzoek uitgevoerd binnen onze groep onder DEC2010-045 hebben we de invloed van de grootte van anxA5 op de tumor opname onderzocht. Het onderzoek was gebaseerd op het feit dat grote moleculen een verhoogde tumor opname hebben als gevolg van het EPR effect. De hypothese was dat een combinatie van passieve en actieve targeting de effectiviteit van de imaging probe verhoogt mits de beeldvorming op het juiste moment na injectie wordt uitgevoerd. Een vereiste hierbij is dat de waargenomen opname van de imaging probe target specifiek is en representatief voor de hoeveelheid apoptose. Uit de resultaten is naar voren gekomen dat de 200 kDa grote PS bindende anxA5 variant (Cys-strep) niet geschikt is als imaging probe voor de detectie van apoptotische cellen aangezien de tumor opname van deze variant voornamelijk EPR gemedieerd en dus minder target specifiek is (figuur 1). De opname van de 200 kDa variant verlaagt door cyclofosfamide behandeling als gevolg van de afname van de micro vasculaire dichtheid in de tumor. De opname is dus niet representatief voor PS aanwezigheid.



Figuur 1: tumor opname en retentie van 36 kDa anxA5 (Cys), 200kDa anxA5 (Cys-strep) en het niet PS bindende 200 kDa anxA5 (M1234-Strep) voor en na cyclofosfamide behandeling.

Doordat bij de opname van de 36 kDa grote PS bindende anxA5 variant het EPR effect minder invloed heeft is deze variant als enige in staat om de toename van celdood na cyclofosfamide behandeling zichtbaar te maken. Om te bewijzen dat deze opname target specifiek is willen we de 36 kDa niet PS bindende anxA5 variant M1234 onderzoeken op zijn tumor opname voor en na cyclofosfamide behandeling. Aangezien de circulatie tijd in het plasma ook invloed heeft op de tumor opname willen we van deze variant ook de circulatie tijd bepalen. Verder willen we voor in vitro

kleuringen (IHC) 5 muizen opofferen op het tijdstip van maximale tumor opname van de varianten M1234 +/- cyclofosfamide, Cys +/- cyclofosfamide, Cys-Strep +/- cyclofosfamide en M1234-Strep +/- cyclofosfamide. Deze muizen worden voor opofferen 1 maal geimaged in de Explore Optix.

**6. Wetenschappelijke beoordeling**

De Principal Investigator (zie voorblad) heeft dit project gelezen en goedgekeurd.

## 5 Proefdier

### 7. Proefdier keuze

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

We gebruiken voor onze experiment de immuno deficiënte Nu/Nu muizen.

Hergebruik: neen.

Uiteindelijke bestemming van het dier na de proef: opoffering onder volledige anesthesie.

#### 7b. Sexe

Beide sexen mogen in gelijke mate vertegenwoordigd zijn aangezien het geslacht niet van belang is voor het doel van onze proef (visualiseren van apoptosis).

#### 7.c. Aantallen

##### Groepen 1 & 2 voorblad:

Tumor opname van M1234-anxA5-AF682 met en zonder cyclophosphamide behandeling:

Met de formule van L. Sachs:  $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin  $2(z\alpha/2 - z\pi)^2 = F$ . Voor een onbetrouwbaarheid van de toets  $\alpha = 0,05$  en een onderscheidingsvermogen ( $\pi$ ) 80% is  $F_{0,80} = 15,7$

Dus  $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding ( $\sigma$ ) is 20% (DEC 2010-045). Variatie van toediening is klein door de uitgebreide ervaring in het uitvoeren van deze methode. Het beoogde effect (d) wordt geschat op 35% (verschil in clearance/mL/minuut).

Dit geeft;  $n = 15,7 * (20/35)^2 = 15,7 * 0,23 = 5,126$

Uitval wordt geschat op 20% op basis van eerdere bevindingen (zie DEC 2005-032)

$(a-0,2a) = 5,126$  of  $0,8a = 5,126$  of  $5,126/0,8 = a$

Dus  $a = 6,408$

Aantal groepen = 2 (Nu/Nu muizen geïnjecteerd met annexine A5-AF682)

**Aantal dieren: 2 groepen x 7 = 14 dieren**

##### Groep 3 voorblad:

Bloed klaring M1234-anxA5-AF682: Hiervan is een statistiek berekening niet nodig daar deze dient ter verkrijgen van de bloed kinetiek. Resultaten uit het verleden (DEC 2010-045; uitbreiding 2) laten zien dat 3 dieren voldoende zijn. **Aantal dieren: 3**

##### Groepen 4, 6, 8, en 10 voorblad:

Voor in vitro kwantificatie middels immunohistochemie (IHC):

Met de formule van L. Sachs:  $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin  $2(z\alpha/2 - z\pi)^2 = F$ . Voor een onbetrouwbaarheid van de toets  $\alpha = 0,05$  en een onderscheidingsvermogen ( $\pi$ ) 80% is  $F_{0,80} = 15,7$

Dus  $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding ( $\sigma$ ) wordt geschat op 20% . Het beoogde effect (d) wordt geschat op 40% (hoeveelheid kleuring/tumor weefsel).

Dit geeft;  $n = 15,7 * (20/40)^2 = 15,7 * 0,25 = 3,925$

Uitval wordt geschat op 10% (bv. niet te analyseren weefsel)

$(a-0,2a) = 3,925$  of  $0,9a = 3,925$  of  $3,925/0,9 = a$

Dus  $a = 4,361$

Immunohistochemie: 5 dieren/groep

4 groepen, dus totaal  $5 \times 4 = 20$  dieren.

**Groepen 5, 7, 9 en 11 voorblad:**

Voor in vitro kwantificatie middels immunohistochemie (IHC):

Met de formule van L. Sachs:  $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin  $2(z\alpha/2 - z\pi)^2 = F$ . Voor een onbetrouwbaarheid van de toets  $\alpha = 0,05$  en een onderscheidingsvermogen ( $\pi$ ) 80% is  $F_{0,80} = 15,7$

Dus  $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding ( $\sigma$ ) wordt geschat op 20% . Het beoogde effect ( $\delta$ ) wordt geschat op 40% (hoeveelheid kleuring/tumor weefsel).

Dit geeft;  $n = 15,7 * (20/40)^2 = 15,7 * 0,25 = 3,925$

Uitval wordt geschat op 10% (bv. niet te analyseren weefsel)

$(a - 0,2a) = 3,925$  of  $0,9a = 3,925$  of  $3,925/0,9 = a$

Dus  $a = 4,361$

Immunohistochemie: 5 dieren/groep

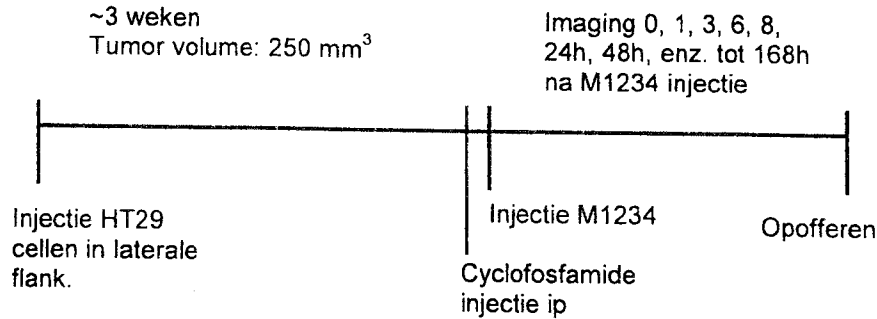
4 groepen, dus totaal  $5 \times 4 = 20$  dieren.

In totaliteit gaat het dus om  $14 + 3 + 20 + 20 = \underline{57 \text{ dieren.}}$

## 7 Dierproef

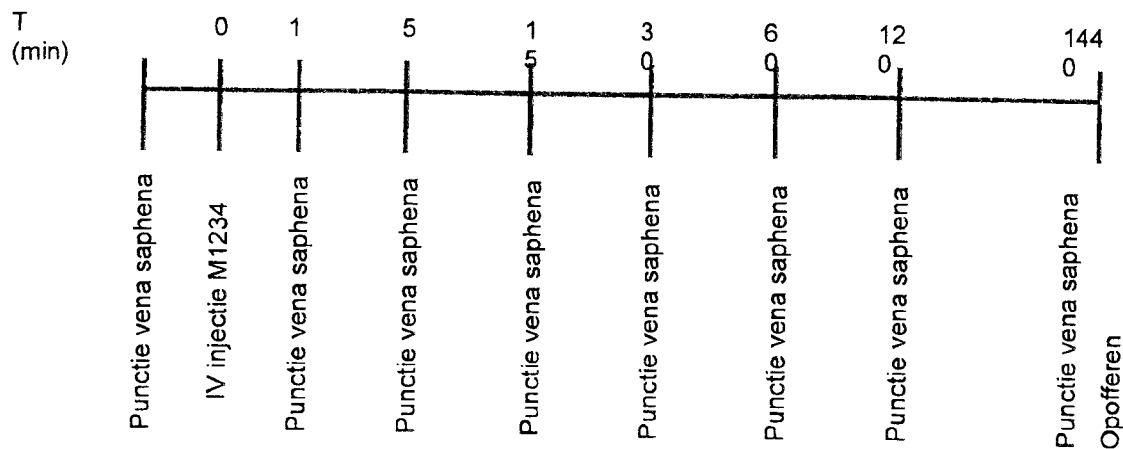
### 8. Experiment

Groepen 1 en 2 worden behandeld volgens onderstaand schema:



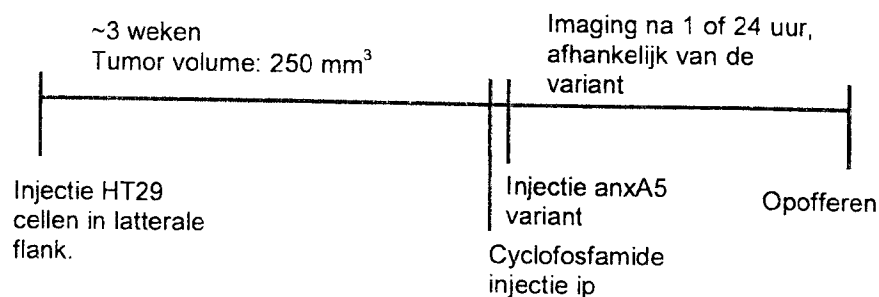
| Groep                      | T=0-168 uur                                                                                                                                                                              | T=168 uur                                                                                                              |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Groep 1: Nu/Nu muizen, n=7 | n=7<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 36kD niet PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%.                              | n=7<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep 2: Nu/Nu muizen, n=7 | n=7<br>Injectie cyclofosfamide ip.<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 36 kD niet bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%. | n=7<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |

Groep 3 wordt behandeld volgens onderstaand schema:



| Groep                      | T=0- 24 uur                                                                                                                                  | T=24 uur                                                                                                             |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Groep 3: Nu/Nu muizen, n=3 | n=3<br>Vena Saphena punctie voor (1 x) en na (7x) staartvene injectie van de 36kD niet PS bindende probe. Explore optix meting bloed sample. | n=3<br>Opofferen muizen, waarna de longen, nieren, lever, hart en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |

Groepen 4 – 11 worden behandeld via onderstaand schema:



| Groep                      | T=0- 1 uur                                                                                                                                                                          | T=1 uur                                                                                                                |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Groep 4: Nu/Nu muizen, n=5 | n=5<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 36kD PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5–2.5%.                              | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep 5: Nu/Nu muizen, n=5 | n=5<br>Injectie cyclofosfamide ip. Fluorescentie imaging onder narcose met 36 kD PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5–2.5%. | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep 6: Nu/Nu muizen, n=5 | n=5<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 36kD niet PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5–2.5%.                         | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |

| Groep                       | T = 0-1 uur                                                                                                                                                                                  | T = 1 uur                                                                                                              |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Groep 7: Nu/Nu muizen, n=5  | n=5<br>Injectie cyclofosfamide ip.<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 36 kD niet PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%.  | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep                       | T = 0-24 uur                                                                                                                                                                                 | T = 24 uur                                                                                                             |
| Groep 8: Nu/Nu muizen, n=5  | n=5<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 200kD PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%.                                      | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep 9: Nu/Nu muizen, n=5  | n=5<br>Injectie cyclofosfamide ip.<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 200 kD PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%.      | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep 10: Nu/Nu muizen, n=5 | n=5<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 200kD niet PS bindende probe : inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%.                                | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |
| Groep 11: Nu/Nu muizen, n=5 | n=5<br>Injectie cyclofosfamide ip.<br>Fluorescentie imaging onder narcose met 200 kD niet PS bindende probe: inleiden met isofluraan 3-4% en vervolgens onderhouden met isofluraan 1.5-2.5%. | n=5<br>Opofferen muizen, waarna de tumor, longen, nieren, lever, en milt word verwijderd voor <i>ex vivo</i> onderzoek |

## 9. Experimentele condities

### 9a. Anesthesie

De fluorescente annexine A5 probes worden intraveneus toegediend via de staartvene. Muizen worden onder anesthesie gebracht met 3-4% isofluraan en onderhouden met 1.5-2.5% isofluraan:

het inspuiten van de annexine probe wordt onder anesthesie gedaan om vervolgens zestig minuten later gemeten te worden met de Explore Optix MX2.

#### **9b. Pijnbestrijding**

Carpromphen (5mg/Kg lichaamsgewicht) wordt subcutaan toegediend 30 minuten voor cyclofosfamide injectie. Werkingsduur carpromphen is 24 uur, toediening carpromphen dagelijks tot einde proef.

#### **9c. Euthanasie en Humane eindpunten**

De anesthesie (bij de opoffering van de dieren) vindt plaats in overleg met het CPV en weergegeven in het werkprotocol. Er zal gekozen worden voor een methode met minimaal ongemak voor de muizen.

Humane eindpunten: euthanasie zal worden toegepast in geval van extreme vormen van ongerief: geen reacties op geluidsignalen, zich slap laten hangen na oppakken, staken van de zelfverzorging, gewichtsafname > 20% en tumor grootte. Bij onduidelijkheden of mogelijke ziekte wordt contact opgenomen met art.14 functionaris.

**10a. Ongerief**

| Groep 1       | aard                           | duur    | frequentie | ongerief  |
|---------------|--------------------------------|---------|------------|-----------|
|               | Tumor injectie                 | 2 min   | 1x         | 03        |
|               | Leven met tumor                | 4 weken | 1x         | 03        |
|               | IV injectie Annexine           | 15 sec  | 1x         | 02        |
|               | explore optics (onder narcose) | 20 min  | 9x         | 03        |
| <b>TOTAAL</b> |                                |         |            | <b>03</b> |

| Groep 2       | aard                           | duur    | frequentie | ongerief  |
|---------------|--------------------------------|---------|------------|-----------|
|               | Tumor injectie                 | 2 min   | 1x         | 03        |
|               | Leven met tumor                | 4 weken | 1x         | 03        |
|               | Cyclofosfamide injectie        | 10sec   | 1x         | 04        |
|               | IV injectie Annexine           | 15 sec  | 1x         | 02        |
|               | explore optics (onder narcose) | 20 min  | 9x         | 03        |
| <b>TOTAAL</b> |                                |         |            | <b>04</b> |

| Groep 3       | aard                 | duur   | frequentie | ongerief  |
|---------------|----------------------|--------|------------|-----------|
|               | IV injectie annexine | 15 sec | 1x         | 02        |
|               | bloedaafname         | 1 min  | 8x         | 03        |
| <b>TOTAAL</b> |                      |        |            | <b>03</b> |

| Groepen 4, 6, 8 en 10 | aard                           | duur    | frequentie | ongerief  |
|-----------------------|--------------------------------|---------|------------|-----------|
|                       | Tumor injectie                 | 2 min   | 3x         | 03        |
|                       | Leven met tumor                | 4 weken | 1x         | 03        |
|                       | IV injectie Annexine           | 15 sec  | 1x         | 02        |
|                       | explore optics (onder narcose) | 20 min  | 4x         | 02        |
| <b>TOTAAL</b>         |                                |         |            | <b>03</b> |

| Groepen 5, 7, 9 en 11 | aard                           | duur    | frequentie | ongerief  |
|-----------------------|--------------------------------|---------|------------|-----------|
|                       | Tumor injectie                 | 2 min   | 3x         | 03        |
|                       | Leven met tumor                | 4 weken | 1x         | 03        |
|                       | Cyclofosfamide injectie        | 10sec   | 1x         | 04        |
|                       | IV injectie Annexine           | 15 sec  | 1x         | 02        |
|                       | explore optics (onder narcose) | 20 min  | 4x         | 02        |
| <b>TOTAAL</b>         |                                |         |            | <b>04</b> |

**10b. Welzijnsevaluatie**

Er zal gewerkt worden volgens de "Code of Practise" Kankeronderzoek. Het ongerief geassocieerd met de Explore Optix meting achten wij gering tot matig, omdat de muis hier buiten de inductie weinig van merkt. Euthanasie wordt verricht onder narcose, hetgeen wij als eveneens als gering ongerief inschatten. Na afloop zal onder algehele verdoving bloed afgenomen worden via een hartpunctie en zullen de dieren ook worden opgeofferd. Fluorescent gelabeld Annexine A5 zijn in studies van ons en anderen hebben nooit negatieve reacties veroorzaakt.

### **11. Verzorging en huisvesting**

Er zullen filtertopkooien gebruikt worden. De muizen kunnen met meerderen samen geplaatst worden. Normale voeding zal ad libitum verstrekt worden. Assistentie van het CPV personeel wordt verzocht voor:

- verzorging van de dieren,
- anesthesie en bloedafname (opoffering),
- aanleveren van de organen (in samenwerking met Overige (zie voorblad), art 12.

Ook de huisvesting wordt verzocht plaats te vinden in de van het CPV Bij calamiteiten kan de V.O. gewaarschuwd worden.

### **12. Deskundigheid**

Het intraveneus toedienen van de annexine probe zal worden uitgevoerd door Overige uitvoerende (zie voorblad), art 12). Zij heeft een uitgebreide ervaring in het uitvoeren van deze experimenten.

### **13. Standard Operation Procedures (SOP)**

SOP\_CPV\_3\_MR

### **Relevante literatuur**

DEC2010-045

1. Laufer et al., 2008
2. Blankenberg et al. 2008

ter info

**From:**  
**Sent:** zondag 14 augustus 2011 13:28  
**To:**  
**Subject:** aanvullig - enkel voor de notificatie

Hoi

Hierbij mijn bijvoeging voor het commentaar op de DEC van  
Ik heb hier op vakantie geen toegang tot de originele files, maar ik zal dit op de DEC vergadering over twee weken wel verder  
toelichten. Dan weet jij in elk geval dat ik er over heb nagedacht en iets mee heb gedaan.  
Groet vanuit een zonnig Italië

Carprofen 5 mg/kg lichaamsgewicht (werkingsduur ~ 24 uur) wordt subcutaan toegediend 30 minuten voor cyclofosfamide injectie.  
Deze toediening wordt dagelijks herhaald tot einde van de proef.

Beste

Bij de aanvraag DEC 2011-110 heb je bij 9b pijnbestrijding NVT geschreven. In mijn ervaring  
wil de DEC hier enige uitleg krijgen waarom pijnstilling niet van toepassing zou zijn. Ik denk  
dat het nu tot een vraag gaat leiden.

Groet

Pustous 616, 6200 MD Maastricht  
T +31-(0)43 388 0161



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, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: “*Real-time imaging van apoptose in een xenograft tumor model*”, is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De titel op het voorblad en van de aanvraag stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.
- De DEC verzoekt bij punt 7c- groep 3, “statische”aan te passen in “statistieke” berekening en op bladzijde 6, bij de groepen 5, 7, 9 en 11, de typefout van 0.50 aan te passen in 0.25.
- De DEC verzoekt de opmerking over de pijnbestrijding (per mail aangeleverd) in de aanvraag aan te passen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC bij groep 1 het ongerief van de “explore optics” aan te passen in code 03 en bij groep 2 het ongerief van de “IV injectie annexine” aan te passen in code 03.

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 **2011-110**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



Aan: DEC Secretariaat

Het DEC protocol "*Real-time imaging van apoptosis in een xenograft tumor model*" (DEC 2011-110) is aangepast naar aanleiding van de vragen die zijn gesteld door de DEC.

:

- De titel op het voorblad en van de aanvraag stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.  
→ Titel is in overeenstemming gebracht. Dit is grijs gemarkeerd in het DEC protocol.
- De DEC verzoekt bij punt 7c- groep 3, "statische" aan te passen in "statistische" berekening en op bladzijde 6, bij de groepen 5, 7, 9 en 11, de typefout van 0.50 aan te passen in 0.25.  
→ Deze typefouten zijn aangepast en grijs gemarkeerd.
- De DEC verzoekt de opmerking over de pijnbestrijding (per mail aangeleverd) in de aanvraag aan te passen.  
→ Dit is aangepast na overleg met de proefdierdeskundige  
→ verder heb ik een extra aanpassing gedaan: op het voorblad hebben de groepen 2, 5, 7, 9 en 11 bij pijnbestrijding de code 04 gekregen (naar aanleiding van de aanpassing onder punt 9).
- Bij punt 10a verzoekt de DEC bij groep 1 het ongerief van de "explore optics" aan te passen in code 03 en bij groep 2 het ongerief van de "IV injectie annexine" aan te passen in code 03.  
→ Dit is aangepast, en grijs gemarkeerd. Enkel, bij groep 2 is ook het ongerief van de explore optics op 3 gezet (en niet annexine injectie), gelijk dit is gedaan voor groep 1.

Met vriendelijke groet,



Aan:

*Ons kenmerk*

*Doorkiesnummer*  
043-

*Maastricht*  
05-09-2011

**Project:** *Real-time imaging van apoptose in een xenograft tumor model.*

DEC-UM  
Voorzitter DEC-UM

**Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

*Secretariaat DEC-UM*  
T (043).

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

**Bezoekadres**

**Projectnummer:** 2011-110

**Postadres**

**Diersoort:** muis

Postbus 616

**Aantal dieren:** 57

6200 MD Maastricht

**Einddatum:** 05-09-2015

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