

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM versie jan. 2005 Nieuw	DECNR: 2011-108 Ontvangen: 04-07-2011
--	---

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
15-07-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot		

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 31964163N
----------------------	------------------------

Titel van het onderzoek:

Metabolomics investigations towards mechanisms and biomarkers for hepatotoxicity

startdatum Augustus 2011
 einddatum ⁹ September 2013
 Duur van de proef¹⁰: 1 dag

	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. Onderzoeker (O ₁)				Art. 9	
5. PI					

Diergroep	1						
ctrl/exp/sham	control						
Diersoort	01						
Stam	C57B16						
Construct / mutatie ?	geen						
Herkomst (leverancier) *	01						
Aantal	110						
Geslacht	mannelijk						
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	6-8 weken						
Doel van de proef *	37						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	01						
Anesthesie *	04						
Pijnbestrijding *	01						
Mate ongerief *	01						
Toestand dier einde exp*	01						

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Metabolomics investigations towards mechanisms and biomarkers for hepatotoxicity

1. Doel van de proef.

Het doel van het onderzoek is om met behulp van toxicogenomics *in vitro* testsystemen te ontwikkelen voor het bepalen van levertoxiciteit van geneesmiddelen. Er wordt getracht biomarkers te identificeren om hepatotoxische eigenschappen van geneesmiddelen te voorspellen. Deze alternatieve testsystemen zouden dierproeven met langdurige bloedstelling kunnen vervangen, en dragen dus bij aan vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven.

Dit toxicologisch onderzoek focust zich op levercellen omdat de lever de belangrijkste plaats is in het lichaam voor wat betreft biotransformatie en detoxificatie van lichaamsvreemde elementen. In dit onderzoek zal gewerkt worden met primaire hepatocyten uit de muis. Hiertoe zullen uit muizen primaire hepatocyten worden geïsoleerd, waarna die in kweek worden gebracht en worden blootgesteld aan geneesmiddelen die steatosis (leververvetting), cholestase (falen van galextractie) of oxidative stress (leverfibrose) kunnen veroorzaken. In totaal zullen 4 bestaande geneesmiddelen per groep van hepatotoxiciteit (steatosis, cholestase en oxidatieve stress) getest worden, dus 12 geneesmiddelen in totaal. Voorlopig is één medicijn per groep geselecteerd: Amiodarone (steatosis), Cyclosporine (cholestase) en Acetaminophen (oxidatieve stress). Op verschillende tijdstippen na blootstelling van de geneesmiddelen aan de primaire hepatocyten worden eiwitten geïsoleerd t.b.v. onderzoek aan het proteoom. Uit muizen waarmee dus geen enkele handeling is verricht, worden de levercellen geïsoleerd t.b.v. *in vitro* onderzoek.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



De gezondheidsrisicoanalyse van geneesmiddelen vindt momenteel onder andere plaats door de beoordeling van acute en chronische toxiciteit in proefdieren *in vivo*. Deze *in vivo* experimenten hebben tal van ethische en praktische nadelen: ze vereisen veel dieren onder stressvolle omstandigheden, ze zijn duur, ongevoelig en tijdrovend. *In vitro* alternatieven (muis lever hepatocyten, muis lever tissue culture slices) zijn voorhanden [1-4]. Echter, de beschikbare biochemische, celbiologische en moleculair biologische analyse technieken stelde tot voor kort onderzoekers slechts in beperkte mate in staat om deze *in vitro* systemen te karakteriseren en hun waarde te beoordelen met betrekking tot de toxicologische risico-evaluatie. De reden hiervoor is dat slechts enkele parameters tegelijkertijd gemeten konden worden. Met behulp van metabolomics technologie is het mogelijk meerdere effecten van geneesmiddelen op het metaboliëtniveau gelijktijdig te bestuderen. Hiermee kunnen meerdere parameters tegelijkertijd onderzocht worden. De verwachting is dat een betere karakterisering van het *in vitro* systeem hierdoor mogelijk is en *in vitro*- *in vivo* extrapolatie beter wetenschappelijk onderbouwd kan worden [5].

Dit onderzoeksplan focust zich daarom op het bepalen van het metabooloom van primaire hepatocyten *in vitro* en gaat na in hoeverre biomarkers geïdentificeerd kunnen worden om hepatotoxische eigenschappen van geneesmiddelen te voorspellen. Er worden hepatocyten gebruikt

omdat de lever een belangrijk doelorgaan is voor toxische stoffen, en omdat hepatocyten zeer competent zijn in de biotransformatie van lichaamsvreemde stoffen (ze bevatten o.a. vele Cytochroom P450 enzymen). Bovendien is gebleken dat bij meerdere nieuw-geïntroduceerde medicijnen een onverwachte levertoxiciteit optreedt wanneer deze op de markt zijn. Deze effecten leiden tot een noodzakelijke terugtrekking van het medicijn met grote financiële gevolgen en dientengevolge ook nieuwe proefdier experimenten met alternatieve kandidaat-medicijnen.

Het project is dus gericht op de ontwikkeling van een nieuwe *in vitro* methode als alternatief voor toxicologische studies met proefdieren en kan daarmee leiden tot een vermindering van het proefdiergebruik voor toxicologische risico-evaluatie.

3. Alternatieven

De primaire hepatocyten welke geïsoleerd worden uit de muizenlevers worden gebruikt in het kader van ontwikkeling van alternatieven voor *in vivo* experimenten met muizen.

Een alternatief voor toxicologische studies aan levercellen zijn HepG2 cellen. Dit zijn humane levertumor cellen welke continue blijven delen. In toxicologische studies reageren deze cellen beduidend anders ten opzichte van primaire hepatocyten [6]. Primaire hepatocyten geven dus een betere fysiologische afspiegeling dan HepG2 cellen.

4. Ethische afweging

Ondanks dat er gebruik wordt gemaakt van proefdieren is dit onderzoek gericht op de ontwikkeling en toepassing van alternatieven voor dierproeven. Voor dit onderzoek zullen levercellen uit muizen geïsoleerd worden waarmee geen enkele handeling is verricht. Door het gebruik van primaire hepatocyten hoeven de dieren niet gedurende lange tijd blootgesteld te worden aan chemicaliën in stressvolle omstandigheden. Bovendien wordt door het gebruik van primaire hepatocyten het aantal proefdieren beperkt omdat uit een lever voldoende cellen gehaald worden om meerdere experimenten uit te voeren. Omdat dit onderzoek zal bijdragen aan vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven, weegt het belang van de proef op tegen het ongerief van het dier.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Toxicogenomics is een nieuwe wetenschappelijke discipline die functionele genomics, proteomics en metabolomics combineert met klassieke toxicologie. Toxicogenomics houdt zich bezig met het verklaren van complete toxische processen aan de hand van veranderingen in de expressie en activiteit van genen, mRNA moleculen, eiwitten en metabolieten. Verondersteld wordt dat toxiciteit veroorzaakt door blootstelling aan chemicaliën verklaard kan worden door veranderingen in de expressie van genen, eiwitten en metabolieten. Door toepassing van toxicogenomics kan dus een beter begrip ontstaan van de biochemische veranderingen als een organisme of een cel wordt blootgesteld aan chemicaliën, en deze kennis kan vervolgens worden gebruikt om nieuwe toxiciteitstesten te ontwikkelen [7].

Dit onderzoeksplan focust zich specifiek op het bestuderen en identificeren van de metabolieten van hepatocyten waarmee hepatoxische eigenschappen van chemische stoffen opgespoord kunnen worden. Verder zullen de verkregen metaboolom-data gebruikt worden om dieperliggende moleculaire mechanismen, die geassocieerd zijn met hepatotoxische mechanismen, verder te ontrafelen. In een vergelijkende studie zal totaal levermateriaal afkomstig van muizen behandeld met cyclosporine en acetaminophen onderzocht worden op proteoom en metaboolom veranderingen. Deze *in vivo* studies zijn reeds eerder uitgevoerd door het [1] te [2], een van de partners in het [3] project. Deze vergelijkende studie zal inzichten geven in overeenkomsten en verschillen tussen de *in vivo* studies en de *in vitro* studies zoals hier voorgesteld. Onderzoek van het metaboolom is belangrijk omwille van verschillende redenen. Zo geeft transcriptie van het mRNA in genoomstudies enkel een ruwe schatting van de mate waarin eiwitten tot expressie worden gebracht. Ten tweede beschrijft de gensequentie geen post-translationele modificaties die essentieel zijn voor de werking van een eiwit. Bovendien geeft de studie van het genoom en proteoom niet alle dynamische cellulaire processen weer en kan metabolomics gebruikt worden om de totale fysiologie van de cel op dat moment in beeld te brengen. Daarom is het essentieel om naast genoom-analyses en proteoom-analyses ook metaboolom-analyses uit te voeren [8, 9]. Toxicogenomics is dus bij uitstek geschikt om m.b.v. *in vitro* modellen de toxische eigenschappen van een verbinding in *in vivo* testen te voorspellen [10-12]. Dit kan kan leiden tot een verdere vervanging van *in vivo* studies door *in vitro* studies.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI (zie voorblad). Dit onderzoeksplan maakt deel uit van onderzoek gedaan binnen het kader van een AIO project "Metabolomics investigations towards mechanisms and biomarkers for hepatotoxicity". Dit AIO project is onderdeel van het onderzoeksprogramma "An applied systems toxicology approach to predicting chemical safety" van het [1] te [2], welke door het [3] wordt gefinancierd. De wetenschappelijke inhoud van het onderzoeksprogramma is door Nederlandse en buitenlandse referenten beoordeeld. Resultaten van dit onderzoek zullen ter publicatie aan worden geboden aan peer-reviewed journals. Hierdoor zal de wetenschappelijke inhoud op uitstekende wijze getoetst kunnen worden.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort, stam: Als soort wordt gekozen voor muizen. Er wordt bewust gekozen voor muizen en niet voor ratten, hiervoor zijn verschillende redenen. Ten eerste neemt de metabole activiteit (voornamelijk cytochroom P450 enzymen) van rat hepatocyten sterk af na isolatie [13, 14]. Daarnaast zal binnen het project gebruik worden gemaakt van muis knock-out modellen. Bovendien is in tegenstelling tot de rat het volledige genoom van de muis gekend, hierbij zijn tevens grote overeenkomsten tussen het humane genoom.

Voor de stam van de muizen wordt gekozen voor C57Bl6 muizen omdat deze reeds gebruikt zijn bij in vivo studies eerder uitgevoerd door het te , een van de partners in het project. Bovendien wordt deze stam ook gebruikt door andere partners binnen het project. Vergelijkende studies worden hiermee mogelijk gemaakt.

Herkomst: CPV, Harlan, Charles River of andere erkende commerciële leverancier.

Eindbestemming: De dieren worden gedood tijdens het uitvoeren van de perfusie.

7b. Sexe

Er zal gebruik worden gemaakt van mannelijke muizen. De reden om niet met beide geslachten te werken is dat er verschillen tussen geslachten bestaan m.b.t. hun metabole capaciteiten om lichaamsvreemde stoffen om te zetten (biotransformatie). Deze verschillen kunnen dus invloed hebben op het metabooloom geïnduceerd door de geneesmiddelen [15-18]. Om de variatie in expressie profielen zo veel mogelijk te beperken, is het daarom van belang om met maar één geslacht te werken. Indien dat niet wordt gedaan, dan zal de variatie groter zijn, en zijn meer experimenten (en dus muizen) nodig om tot significante resultaten te komen.

De keuze voor mannetjes i.p.v. vrouwtjes, is omdat in genetische toxicologie testen gericht op effecten in primaire hepatocyten mannetjes het geprefereerde geslacht zijn [19]. Bovendien kunnen zo onze onderzoeksresultaten vergeleken worden met eerder uitgevoerde experimenten (zie studie).

7.c. Aantallen

In twee jaar tijd zullen voor dit project 110 dieren worden gebruikt. Dit aantal is gebaseerd op het aantal chemicaliën dat zal worden onderzocht (namelijk 12, met ieder 3 onafhankelijke experimenten en enkele voorbereidende experimenten om de optimale dosis en tijdsduur te bepalen). De berekening voor het benodigde aantal hepatocyten cultures, en de daarvoor benodigde aantal muizen, staat hieronder weergegeven:

1. Aantal chemicaliën	12
2. Aantal experimenten	3
3. Aantal dosissen	6
4. Aantal behandelingstijden	3
5. Aantal cultures per behandeling	3
Totaal aantal cultures (1x2x3x4x5) +10 % voor dose-finding studies en eventuele uitval.	2138
Aantal cultures dat per lever kan worden verkregen	20
Aantal benodigde muizen	110

8. Experiment

De dieren die in deze experimenten zullen worden gebruikt, worden gehouden op standaard voer en water en zullen niet *in vivo* worden behandeld. Primaire hepatocyten worden uit de muizenlever geïsoleerd volgens een standaardprotocol. Het dier wordt onder narcose gebracht door toediening van 90 mg/kg i.p. pentobarbital. Pentobarbital is een barbituraat. Barbituraten worden voornamelijk gebruikt voor inductie en/of behoud van algemene anesthesie [20-21]. Anesthesie met pentobarbital is de standaardmethode bij het isoleren van primaire hepatocyten uit muis en rat [1, 5]. In eerder genoemde *in vivo* studies werd gebruikt gemaakt van pentobarbital, om vergelijking mogelijk is het gebruik van pentobarbital noodzakelijk. Het is bekend dat pentobarbital effecten heeft op de lever, zoals op de activiteit van biotransformatie enzymen, wat echter wel pas optreedt vele uren na toediening. Echter, aangezien de hepatocyten na isolatie een aantal keren worden gewassen, zal het pentobarbital niet meer in de cellen aanwezig zijn en dus de studies beïnvloeden. Andere anesthetica werden overwogen (b.v. inhalatie van iso-fluraan), maar deze zijn niet in andere vergelijkbare studies gebruikt (zijn mogelijk dus niet geschikt) [1, 5]. Decapicatie is in dit onderzoek geen optie aangezien het bloed gedurende de start van de perfusie in circulatie dient te zijn. Direct na het perfuseren van de lever via de poortader wordt het dier gedood d.m.v. het doorknippen van de vena-cava en aorta.

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
	Geen <i>in vivo</i> behandeling	Anesthesie door i.p. toediening 90 mg/kgpentobarbital; tweetraps leverperfusie via de poortader; euthanasie door doorknippen vena-cava en aorta.	Per experiment 4- 8 muizen.	Man

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De muizen worden voor aanvang van de leverperfusie onder volledige anesthesie gebracht met 90 mg/kg lichaamsgewicht Pentobarbital i.p.

9b. Pijnbestrijding

De perfusie vindt plaats onder anesthesie en kort na aanvang van de perfusie zullen de dieren gedood worden door het doorknippen van de vena cava en de aorta.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De muizen worden voor aanvang van de leverperfusie onder volledige anesthesie gebracht met 90 mg/kg lichaamsgewicht Pentobarbital i.p. Zodra de poortader gecannuleerd is en de perfusie begint, worden de muizen direct gedood door verbloeding middels het doorknippen van de vena cava en de aorta. De dieren zullen dus gedood worden zonder voorafgaande blootstelling aan genoemde medicijnen. Het prikken wordt uitgevoerd door een geoefende persoon en de toe te dienen vloeistof zal op 37°C gebracht worden: gering ongerief.

Vóór het experiment worden geen handelingen met de dieren uitgevoerd. Gedurende deze tijd wordt geen ongerief verwacht. Moest zich toch ongerief voordoen door ziekte dan zullen de dieren geëuthanaseerd worden als volgende symptomen zich voordoen: niet meer wassen zodat rood traanvocht zichtbaar wordt rond ogen en neus, abnormale lichaamshouding bv. sterk gebogen rug en abnormaal gedrag bv. staartknagen.

10a. Ongerief



De muizen zullen d.m.v. éénmalige i.p. injectie met pentobarbital verdoofd worden. De prik brengt een kleine mate van ongerief mee, waardoor de mate van ongerief geschat wordt op gering = 01.

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

10b. Welzijnsevaluatie

11. Verzorging en huisvesting

De muizen worden min per 2 en max. per 4 gehuisvest in macrolon kooien type 1 met bedding, een rol of tissue als kooiverrijking. De muizen hebben ad libitum toegang tot water en voeding. De dieren worden gehuisvest bij het CPV van de Universiteit Maastricht onder constante temperatuur, en luchtvochtigheid gelijk aan de temperatuur en luchtvochtigheid binnen het CPV, een dag- nacht lichtregiem en achtergrondmuziek.

12. Deskundigheid

De handelingen met de dieren zullen uitgevoerd worden door VO die bevoegd is d.m.v. art.9 en zal worden ondersteund door O₁ die bevoegd is d.m.v. art.9 en ervaring heeft met leverperfusies.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Bijlage 1: perfusie van de muis.

Relevante literatuur

- 1) Wang Y-J., Liu H-L., Guo H-T., Wen H-W., Liu J. (2004): **"Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich"**. World J Gastroenterol 10 (5): 699-702.
- 2) Engl T., Boost K.A., Leckel K., Beecken W.D., Jonas D., Oppermann E., Auth M.K., Schaudt A., Bechstein W.O., Blaheta R.A. (2004): **"Phosphorylation of hepatocyte growth factor receptor and epidermal growth factor receptor of human hepatocytes can be maintained in a (3D) collagen sandwich culture system"**. Toxicol In Vitro 18: 527-532.
- 3) Seglen P. O. (1976): **"Preparation of isolated rat liver cells"**. Methods Cell Biol 13: 29-83.
- 4) Beken S. T., Vanhaecke, *et al.* (1998): **"Collagen-gel cultures of rat hepatocytes: collagen-gel sandwich and immobilization cultures"**. Methods Mol Biol 107: 303-9.
- 5) Beigel J., Fella K., Kramer P.J., Kroeger M., Hewitt P. (2008): **"Genomics and proteomics analysis of cultured primary rat hepatocytes"**. Toxicology in Vitro 22: 171-181.
- 6) Wang K., Shindoh H., Inoue T., Hori I. (2002): **"Advantages of *in vitro* cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines"**. The Journal of Toxicological Sciences 27: 229-237.
- 7) Waters M.D., Fostel J.M. (2004): **"Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects"**. Nature reviews 5: 936-948.
- 8) Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. (2004): **"Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology"**. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5: 763-769.
- 9) Robertson D.G., Watkins P.B., Reily M.D. (2011): **"Metabolomics in Toxicology: Preclinical and Clinical Applications"**. Toxicological Sciences 120: S146-S170.
- 10) McMillian M., Nie A.Y., Parker J.B., Leone A., Kemmerer M., Bryant S., Herlich J., Yieh L., Bittner A., Liu X., Wan J., Johnson M.D. (2004): **"Inverse gene expression patterns for macrophage activating hepatotoxins and peroxisome proliferators in rat liver"**. Biochem Pharmacol 67: 2141-2165.
- 11) McMillian M., Nie A.Y., Parker J.B., Leone A., Bryant S., Kemmerer M., Herlich J., Yieh L., Bittner A., Liu X., Wan J., Johnson M.D. (2004): **"A gene expression signature for oxidant stress/reactive metabolites in rat liver"**. Biochem Pharmacol 68: 2249-2261.
- 12) Waring J.F., Ciurlionis R., Jolly R.A., Heindel M., Ulrich R.G. (2001) **"Microarray analysis of hepatotoxins *in vitro* reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity"**. Toxicol lett 120:359-368.
- 13) Boess F., Kamber M., Romer S., Gasser R., Muller D., Albertini S., Suter L. (2003) **"Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the *in vivo* liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of *in vitro* systems"**. Toxicol Sci. 73:386-402.
- 14) Balls M, Bogni A, Bremer S, Casati S, Coecke S, Eskes C, Prieto P, *et al.* (2002) **"Alternative (Non-animal) Methods for Chemical Testing: Current Status and Future Prospects"** Altern. Lab. Anim. 30 suppl 2:1-125.
- 15) Wiwi C. A., Waman D.J. (2005): **"Role of Hepatocyte Nuclear Factors in Transcriptional Regulation of Male-specific CYP2A2"**. J Biol Chem 280 (5): 3259-3268.
- 16) Thangavel C., Garcia M.C., Shapiro B.H. (2004): **"Intrinsic sex differences determine expression of growth hormone-regulated female cytochrome P450s"**. Molec Cell Endocrinol 220: 31-39.
- 17) Visalli T., Turkall R., Abdel-Rahman M.S. (2005) **"Gender differences in cocaine pharmacokinetics in CF-1 mice"**. Toxicol Lett, 155:35-40.
- 18) Davis W., Hewer A., Rajkowski K.M., Meinel W., Glatt H., Phillips D.H. (2000): **"Sex differences in the activation of tamoxifen to DNA binding species in rat liver *in vivo* and in rat hepatocytes *in vitro*: role of sulfotransferase induction"**. Cancer Res 60: 2887-2891.

- 19) Madle S., Dean S.W., Andrae U., Brambilla G., Burlinson B., Doolittle DJ, Furihata C, Hertner T, McQueen CA, Mori H (1994) **"Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*"**. Mutat Res, 312:263-285.
- 20) Green C.J (1982): **"Laboratory animal handbook 8. Animal anesthesia"**. London: Laboratory Animals Ltd.
- 21) McLaughlin S. (1988): **"Anesthesia-Barbiturates. Part I and II"**. CALAS (Can. Assoc. Lab. Anim. Sci.) Newsl. 20(5): 104-110.

leverperfusie bij de muis**Voorbereiding**

- Werkoplossingen maken
- Perfusieopstelling klaarzetten: buizen aansluiten en spoelen met ethanol, dissectiemateriaal in ethanol zetten
- Perfusieopstelling klaarmaken: buizen spoelen met steriel MQ en vervolgens met perfusiebuffer, pompdebiet meten, dissectiemateriaal klaarleggen, klemmen en canules klaarleggen, operatietafel klaarzetten
- Perfusie- en collagenasebuffer in het warmwaterbad zetten en 0,5M CaCl₂ toevoegen aan de collagenasebuffer

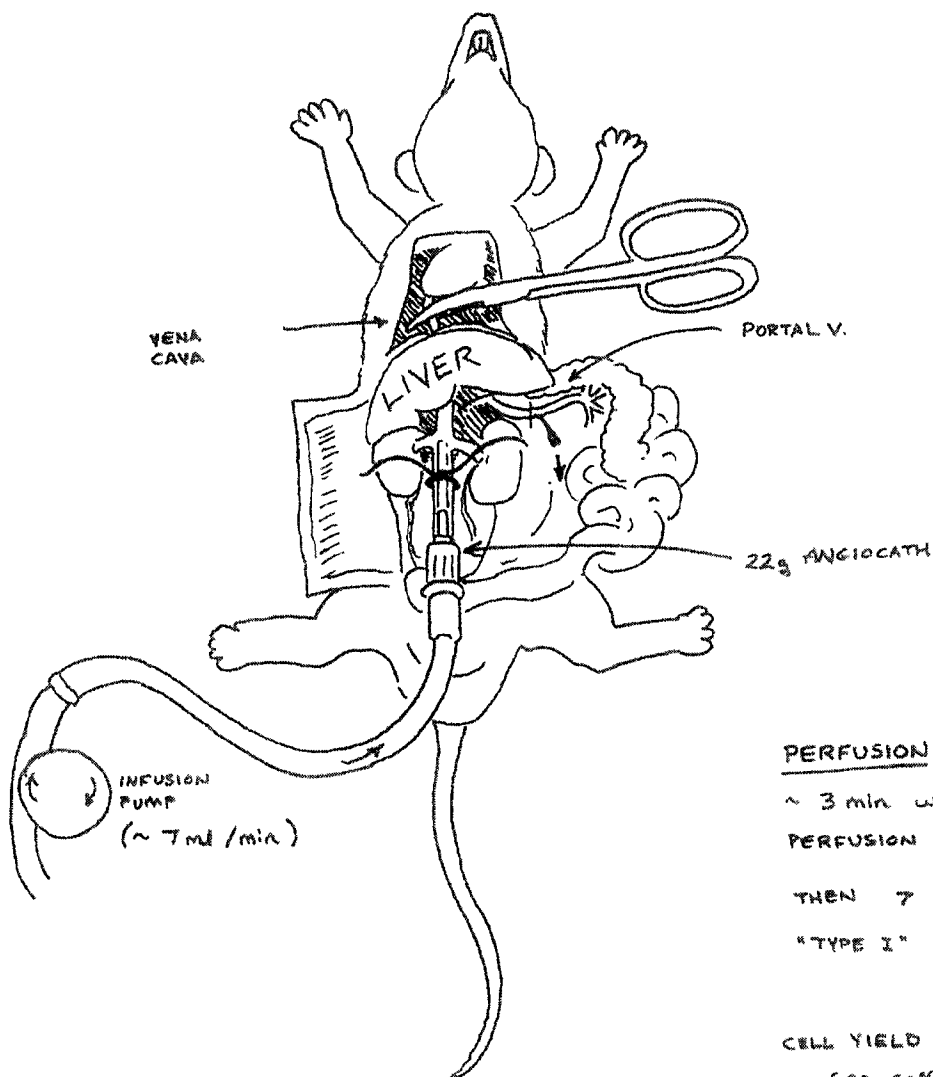
Narcose

- Maak de verdunning van pentobarbital: 40µl bij 560µl 0,9% NaCl
- Weeg de muis en verdoof ze met pentobarbital (100 tot 150 mg/kg lichaamsgewicht; i.p. injectie)

Nadat de muis voldoende onder de narcose is:

- Fixeer de muis op de dissectietafel door de pootjes vast te kleven
- Ontsteek de lamp
- Ontsmet de incisiezone met alcohol
- Maak een incisie in de vacht ter hoogte van de buik
- Open de vacht volledig longitudinaal van onder naar boven tot aan het sternum
- Open de vacht lateraal in de richting van de 4 poten
- Open het buikvlies volledig van onder naar boven
- Open het buikvlies lateraal zodat de buikinhoud maximaal vrij komt
- Leg alle ingewanden naar de rechterkant en
- De muis moet altijd in leven blijven tijdens dit stadium, indien dit niet het geval is, experiment stil leggen
- Zet de pomp op stand 0.2
- Breng de naald in de vena cava inferior (diep genoeg in de vene!)
- Zet een klem op de naald
- Laat de naald rusten op onderliggend weefsel in het verlengde van de vene
- Laat de perfusiebuffer stromen aan 2ml/min (pomp op 0.5)
- Knip de vena porta door
- Verhoog de flow naar 7ml/min (pomp op 1)
- Knip het diafragma door en open de borstholte
- Klem de vena cava superior af
- De lever moet meteen en uniform wit worden
- Perfundeer ongeveer 3 min om de lobben goed te wassen

- Verwissel de perfusiebuffer met de dissociatieoplossing door de slang in de dissociatieoplossing te leggen
- Perfundeer ongeveer 7min
- Observeer de evolutie van het uiterlijke aspect van de lever (granuleus aspect, uniformiteit, zwelling, transpiratie, ...)
- Stop de perfusie wanneer de lever voldoende gedissocieerd is
- Stop de peristaltische pomp
- Verwijder de naald
- Isoleer de lever uit het dier door de adhesie met het diafragma en andere organen door te knippen; let hierbij op dat het vlies rond de lever en de maag niet doorpikt wordt
- Plaats de lever in een kristalleerschaal en voeg wat hechtmedium toe
- De hepatocyten kunnen nu uit de lever geïsoleerd worden



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
18-07-2011

Project: Metabolomics investigations towards mechanisms and biomarkers for hepatotoxicity.

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: 2011-108
Diersoort: muis
Aantal dieren: 110
Einddatum: 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