

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

versie jan. 2005

Herziene versie

DECNR: 2011-143

Ontvangen: 14-11-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
14-11-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM X	NUTRIM	Hersenen gedrag	en	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	------------	--------	--------------------	----	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

Financieel beheerder	
-------------------------	--

Budgetnummer	30983335B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Non-invasieve imaging van vasculaire functie in muizenmodellen van cardiovasculaire ziekte.

startdatum 01-01-2012

einddatum 31-12-2014

Duur van de proef¹⁰: 25 weken

Naam

Tel (+ Tel privé E-mailadres
enkel VO, VVO en
VM)

Bevoegd-
heid⁵

Cap.
groep
/afdeling

1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)
2. Vervanger VO (VVO)
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO⁷
4. Verzoegers CPV
5. overige uitvoerenden

Art.9
Art. 9
nvt
Art.9

Diergroep	1	2	3	4	5		
ctrl/exp/sham	ctrl	HFD	HFD + pyri	DbDb	DbDb + pyri		
Diersoort	01	01	01	01	01		
Stam	C57bl6/j	C57bl6/j	C57bl6/j	DbDb	DbDb		
Construct / mutatie ?	geen	geen	geen	geen	geen		
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01		
Aantal	15	15	15	15	15		
Geslacht	Mannelijk	Mannelijk	Mannelijk	Mannelijk	Mannelijk		
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja		
Leeftijd/gewicht	11 weken	11 weken	11 weken	5 weken	5 weken		
Doel van de proef *	31	31	31	31	31		
Belang van de proef *	01	01	01	01	01		
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01		
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01		
Anesthesie *	04	04	04	04	04		
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01		
Mate ongerief *	04	04	04	04	04		
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01		

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Non-invasieve imaging van vasculaire functie in muizenmodellen van cardiovasculaire ziekte.

1. Doel van de proef.

Hart- en vaatziekten zijn doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd. Naast diabetes (suikerziekte) zijn ook o.a. obesitas (zwaarlijvigheid), hypertensie (hoge bloeddruk) en arteriosclerose (aderverkalking) risicofactoren voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten. Kenmerken van deze risicofactoren (zoals verhoogde suikers, vetten en een tekort aan zuurstof) kunnen schade veroorzaken aan onze bloedvaten. Langdurige blootstelling leidt vervolgens ook tot schade aan belangrijke organen zoals het hart en onze nieren. Op onze afdeling (interne geneeskunde) hebben we de mogelijkheden om op verschillende niveaus deze risicofactoren van hart- en vaatziekten, en hun gevolgen, in beeld te brengen.

In de literatuur zijn humane studies te vinden die hebben laten zien dat verschillende voedingscomponenten in staat zijn om het ontstaan van hart- en vaatziekten te beïnvloeden door middel van het verbeteren van de vasculaire functie. Deze aannames zijn gedaan door gebruik te maken van zeer grote aantallen proefpersonen en verschillende surrogaat markers van vasculaire functie. Echter is vasculaire functie een zeer breed concept dat een grote verscheidenheid aan biologische processen en markers omvat. Daarom is er ondanks de bekende acute effecten van voeding op "vasculaire functie", nog niet veel informatie over de daadwerkelijke relevantie hiervan op de ontwikkeling van latere hart- en vaatziekten.

Dit huidige onderzoek, dat naast dierenmodellen van hart- en vaatziekten ook gebruik maakt van humane interventie- en prospectieve cohort studies, maakt deel uit van een project dat de causaliteit tussen de effecten van voeding op vasculaire functie en het latere ontstaan van hart- en vaatziekten onderzoekt. Binnen deze verschillende methodes van aanpak wordt er zoveel mogelijk gefocust op dezelfde voedingsblootstelling, vasculaire functie markers, en hart- en vaatziekten.

De translatie tussen deze onderzoeken in proefpersonen enerzijds en dierenmodellen anderzijds is nog steeds een grote uitdaging. Om een betere vertaalslag te maken van dierenstudies tot humane klinische applicaties zijn er technieken nodig die de arteriële eigenschappen en veranderingen in beeld kunnen brengen in beide species en het liefst non-invasief in de tijd. Naast de bestudering van biomarkers in bloed en urine, dat we momenteel al op grote schaal toepassen, zijn we ook op zoek naar betrouwbare non-invasieve metingen van de bloedvaten in verschillende proefdiermodellen van cardiovasculaire ziekten.

Lange tijd waren de veel toegepaste ultrasound technieken in humane studies niet gevoelig genoeg om de relatief kleine bloedvaten van bijvoorbeeld de muis in beeld te brengen. Echter met de komst van "high resolution & high frequency" (al dan niet contrast enhanced) ultrasoundsystemen zoals de vevo2100 (en bijbehorende transducers) zijn er wellicht meer mogelijkheden, maar deze moeten nog wel verkend en geoptimaliseerd worden.

In een eerder pilot onderzoek (DEC 2011-079, dat nu nog loopt) is er een begin gemaakt om de verschillende technieken aan te leren, en de toepasbaarheid in te schatten binnen dit huidige project.

Doel van het huidig project is dan ook 2-delig.

- 1) het implementeren van een verscheidenheid aan non-invasieve vasculaire functie metingen in muizenmodellen van hart- en vaatziekten.

- 2) Het herhaaldelijk in beeld brengen van het ontstaan van vasculaire dysfunctie en vervolgens hart- en vaatziekten en onderzoeken of een bepaalde voedingsinterventie dit kan beïnvloeden.

Er zal gebruik worden gemaakt van 2 muizen modellen van hart- en vaatziekten. De c57bl6/j muis op een hoog vet dieet enerzijds, en de obese DbDb muis anderzijds.

In dit project zal er tevens als interventie gebruik worden gemaakt van een verbinding uit de vitamine B-6 groep, pyridoxamine, waarvan bekend is dat het biochemische processen remt die betrokken zijn bij de ontwikkeling van o.a. schade aan de nieren. In vervolg studies zal de interventie groep aangepast worden op de resultaten verkregen uit de humane interventie studies.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Het aantal patiënten met hart- en vaatziekten is sinds de tweede helft van de jaren negentig sterk gestegen. Naar verwachting zal dit probleem verder toenemen door de huidige leefstijl (toename overgewicht) en de vergrijzing van onze samenleving. In dit experiment zullen de vaateigenschappen in de gezonde en zieke muis non-invasief in te tijd worden vervolgd. Hierdoor wordt veel mechanistische kennis opgedaan over de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, zodat in de toekomst de problematiek eerder wordt ontdekt en er ook eerder kan worden ingegrepen. Verder zal er (ook nog op een later tijdstip) een voedingsinterventie worden gedaan om te kijken of dit de ontwikkeling van vaatcomplicaties kan tegengaan. Samengevat zal de kennis die verworven wordt van belang zijn voor het vergroten van ons inzicht omtrent de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, maar ook de samenstelling van klinische voedingsmiddelen die een belangrijke rol kunnen gaan spelen in het voorkomen en verminderen van klachten.

3. Alternatieven

De ontwikkeling van hart- en vaatziekten betreft een ingewikkeld multifactorieel proces dat verschillende celtype beïnvloed. Dergelijke processen kunnen niet *in vitro* nagebootst worden. Voor dit type experimenten zijn dus proefdieren nodig. Echter zal er door de implementatie van verschillende non-invasieve technieken in de toekomst meer informatie vergaard kunnen worden met minder proefdieren.

4. Ethische afweging

Hart- en vaatziekten zijn een van de belangrijkste bedreigingen van de gezondheid van deze tijd. Het aantal patiënten is de laatste jaren enorm toegenomen. Het identificeren van voedingsbestanddelen met o.a. ontstekingsremmende en of oxidatieve stress-remmende effecten middels *in vivo* (zowel dier als humaan) onderzoek kan een belangrijke bijdrage leveren aan het verminderen van de gezondheidsproblemen die ontstaan bij mensen met een slechte vaatfunctie. Het gebruik van proefdieren speelt hierbij een belangrijke rol, mede ook door de mogelijkheid van het gebruik van genetische interventies en het onderzoeken van orgaan en weefselschade in meer detail.

Het grote voordeel van de opzet van dit onderzoek (en de toekomstige interventie studies) is dat het mogelijk zal zijn om de dieren non-invasief in de tijd te kunnen volgen met technieken die ook in humane onderzoeksstudies gebruikt worden. Hierdoor wordt er niet alleen meer kennis opgedaan over de ontwikkeling van hart- en vaatziekten (al vanaf een vroeg tijdstip) maar zullen we ook met minder proefdier gebruik meer informatie kunnen verzamelen.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Er is een grote behoefte aan de herhaaldelijke metingen van functie, structuur en andere eigenschappen van het cardiovasculair systeem in muizen modellen van hart- en vaatziekten en veroudering. De grootste uitdaging voor het vinden van de juiste methodes betreffen de afmeting van de muis en de hoge hartslag, die zorgen voor extreme eisen aan de spatiele en temporale resolutie. Verder zijn herhaaldelijke blootstelling aan invasieve operaties (plaatsen van bijvoorbeeld flowmeters) en straling, niet gewenst. Om deze problemen te overkomen lijkt het in beeld brengen van het cardiovasculair systeem met ultrasound de beste aanpak. Door de beschikbaarheid van hoge resolutie systemen (Vevo2100) en het gebruik van niet schadelijke contrast verbeterende middelen (microbubbles) zijn deze ultrasound metingen theoretisch zelfs herhaaldelijk en non-invasief toe te passen in de muis.

Een belangrijke voorspeller van hart- en vaatziekten is arteriële stijfheid, en deze stijfheid kan door verschillende maten in beeld worden gebracht.

Bij de contractie van het hart wordt er een pulse of energie golf gecreëerd die vervolgens in de circulatie wordt doorgegeven. De snelheid van deze golf (pulse wave velocity of PVW) is gerelateerd aan de stijfheid van de vaten. Toegenomen PVW blijkt prognostisch te zijn voor vasculaire ziekten en mortaliteit in mensen met nephropathie, hypertensie, en diabetes. Een veel gebruikte methode in de mens om PVW te meten is door op 2 verschillende plekken (carotis en femoralis) de golf te meten. Vervolgens wordt de afstand gemeten tussen de 2 meetpunten en kan de snelheid die de golf heeft worden afgeleidt. Op deze manier wordt een regionale PVW berekend (Nichols 2005). In de muis lijkt het echter ook mogelijk om bijvoorbeeld de PVW specifiek te meten in bijvoorbeeld de carotis en aortaboog (Hartley 1997, Williams 2007).

Een andere maat voor vasculaire stijfheid is de compliance. Compliance is gedefinieerd als de verandering in volume per unit van druk ($\Delta V/\Delta P$) en weerspiegelt de buffer capaciteit van het bloedvat. Arteriële compliance (C) is gerelateerd aan arteriële distensibiliteit (D) en arterieel volume (V) met de formule $C=D \times V$. Distensibiliteit, gedefinieerd als de relatieve verandering in volume per unit van druk ($[\Delta V/V]/\Delta P$), wordt beschouwd als een determinant van stress aan de vaatwand.

Volume en volume veranderingen worden non-invasief bepaald door de verschillen in lumen cross-sectional area (CSA) per unit van druk. Deze simplificatie gaat ervan uit dat de toename van volume tijdens een cardiale cyclus wordt veroorzaakt door een toename in lumen CSA en niet door een toename van de lengte van het vat. De Area toename wordt berekend vanuit de eind diastolische diameter (d) en de verandering in bloedvat diameter tijdens de cardiale cyclus (Δd) (Guyton 1986).

Voor het in beeld brengen van de vaten en bloedstromen in de allerkleinste vaten, de microcirculatie, zal er gebruik moeten worden gemaakt van contrast versterkende middelen. Ultrasound contrast middelen zoals microbubbles zijn typisch gemaakt om het akoestisch signaal van het in bloed in de circulatie de versterken. Het contrast bestaat meestal uit gas gevulde (bijv. stikstof) microbubbles omkapselt met lipiden resulterend in een diameter van 2 tot 3 μm . Microbubbles $<5 \mu m$ in diameter zijn klein genoeg om vrij door de circulatie te bewegen en laten het gas langzaam vrij in het plasma. Microbubbles worden totaal verwijderd uit het bloed in circa 15 minuten, doordat het gas vanuit het plasma en de longen wordt uitgestoten en de lipiden componenten door het bloed, lever en nieren. Hierdoor zijn de dus een ideale bloed volume marker en kunnen ze eenmaal gevisualiseerd zorgen voor kwantificatie van regionale microvasculaire blood flow metingen (Sullivan 2009).

Verder zullen ook nog bloeddruk metingen en glycocalyx dikte metingen in het oor (met een Sidestream Dark Field camera) geïmplementeerd worden in het onderzoek om een breed scala aan

informatie te vergaren over belangrijke parameters van cardiovasculair functioneren tijdens het verloop van ziekten zoals diabetes en/of hypertensie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit pilot onderzoek maakt deel uit van een postdoctoraal onderzoek met de titel: "validation of non-invasive measurements of vascular function markers as related to cardiovascular disease in mice and rats". Het project is extern beoordeeld, gefinancierd en goedgekeurd door Top Institute Food & Nutrition (TIFN). Intern is dit project beoordeeld en goedgekeurd door zowel

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

We zullen gebruik maken van twee verschillende modellen van hart- en vaatziekten in de muis die gekenmerkt worden door typische risicofactoren zoals o.a. overgewicht, Westers dieet, hypertensie, en diabetes. Er zal gebruik worden gemaakt van C57bl6/J muizen van het Jackson laboratorium (stock 000664, besteld via Charles River), waarvan bekend is dat ze indien ze worden voorzien van een hoog vet dieet, complicaties zullen ontwikkelen aan het nieren, hart en bloedvaten. Verder zullen we ook gebruik maken van DbDb muizen (stock 000642, besteld via Charles River), die door een mutatie in de leptine receptor, gekenmerkt worden door overgewicht, diabetes en de latere ontwikkeling van hart- en vaatziekten.

De C57bl6/J muizen worden gebruikt vanaf een leeftijd van 12 weken, waarna ze gedurende 24 weken op verschillende tijdstippen worden vervolgd. Na 24 weken zullen de muizen worden ge-euthanaseert en gedissecteed, vervolgens zullen de verschillende weefsels en bloed worden opgeslagen voor analyse met behulp van microscopie, western-blot en LC-MSMS. Aorta en mesenteriale arteriën zullen worden gebruikt voor vasoreactiviteits metingen met een wire-myograph.

Omdat het DbDb fenotype zich al vroeg ontwikkelt zullen deze muizen vanaf 6 weken oud gevolgd worden, totdat ze een leeftijd van 24 weken bereiken.

7b. Sexe

Er zal gebruik worden gemaakt van mannelijke muizen. De reden hiervoor is dat het bekend is dat oestrogenen een beschermend effect hebben op de ontwikkeling van hart- en vaatziekten.

7c. Aantallen

Er zijn binnen dit experiment 5 verschillende onderzoeksgroepen.

- 1) C57bl6/J
- 2) C57bl6/J met hoog vet dieet
- 3) C57bl6/J met hoog vet dieet + pyridoxamine interventie
- 4) DbDb muizen
- 5) DbDb muizen + pyridoxamine interventie

Er zullen verschillende technieken gebruikt worden, waarvan de spreiding nog grotendeels onbekend is. Verder zal het onderscheidend vermogen tussen de groepen in de eerste weken van de studie nog klein zijn, omdat verwacht wordt dat de veranderingen toenemen in de tijd. Exacte groeps grootte zijn dus moeilijk te berekenen, en zullen verschillen per meting, parameter en zelfs tijdstip.

Als we de echo van het hart als uitgangsmethode gebruiken weten we uit een studie van Li et al. (Acta pharmaco sin, 2010), dat het slagvolume van de DbDb muis op een leeftijd van 18 weken ongeveer 18% lager is t.o.v. controles. De spreiding op de meting was ca. 15%.

Echter een studie binnen de UM (Daniels *et al.* Acta Physiol, 2010) zag geen verschillen op een leeftijd van 18 weken. De spreiding in hun meting was ook circa. 15%, maar door de lage gebruikte aantallen (n=6 per groep), was het dus niet mogelijk om een verschil van eventueel 18% aan te tonen. Om dit eventuele effect aan te tonen hebben we de volgende aantallen nodig:

Spreiding: 15%
Beoogde effect: 18%

Uitgegaan is van een β van 0.80 en een α van 0.05.
Dan is $F_{0.80} = 15.7$

$$n = 15.7 \times (15/18)^2 = 11 \text{ dieren}$$

Alle dieren worden langdurig vervolgt, waarbij ze 4x, gedurende ca. 2uur, onder narcose zullen gaan. Verder is het niet alleen denkbaar dat we muizen verliezen door ziekte en narcose ingreep, maar ook dat sommige metingen niet altijd lukken. We hebben daarom in overleg met Dr. Frans van Nieuwenhoven (die ervaring heeft met deze modellen) het uitval percentage op 25% in alle groepen geschat.

$$(a - 0,25a) = 11 \quad \text{of} \quad 0,75a = 11 \quad \text{of} \quad 11/0,75 = a \quad \text{Dus} \quad a = 15$$

Van elke groep zijn er dus 15 muizen nodig, in totaal zijn er dus 75 muizen nodig voor dit experiment.

8. Experiment

De C57bl6/j (n=45) en DbDb muizen (n=30) worden besteld zodat ze op een leeftijd van 5 weken binnenkomen bij het CPV. Daarna worden ze met 2 of 3 muizen (voorkeur uit zelfde nest), met elkaar gehuisvest per kooi.

De dieren worden als volgt verdeeld over 5 groepen (elke groep 3 kooien van n=2, en 3 kooien van n=3)

:

- 1) C57bl6/J
- 2) C57bl6/J met hoog vet dieet
- 3) C57bl6/J met hoog vet dieet + pyridoxamine interventie (2 gram/L in drinkwater).
- 4) DbDb muizen
- 5) DbDb muizen + pyridoxamine interventie (2 gram/L in drinkwater).

Model 1: hoog vet diet (groep 1, 2 and 3)

→ C57BL/6j muizen worden vanaf een leeftijd van 12 weken oud voor 24 weken gevolgd (leeftijd aan eind is dus 36 weken).

Model 2: DbDb muizen (groep 4 & 5)

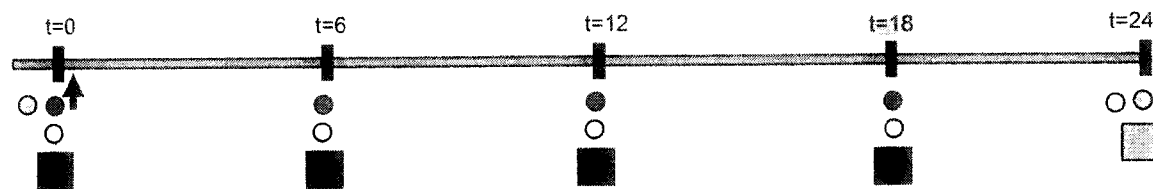
→ DbDb muizen worden vanaf een leeftijd van 6 weken oud voor 18 weken gevolgd (leeftijd aan eind is dus 24 weken).

Metingen (zie flowchart):

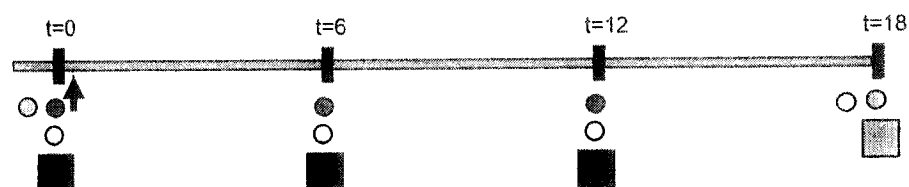
- Een paar dagen voor de baseline vasculaire functie metingen wordt er nuchter (4 uur) bloed afgenomen (voor insuline, glucose and lipide metingen), m.b.v. een vena saphena punctie (~200µl).
- Op baseline (beide modellen), na 6 weken (beide modellen), na 12 weken (beide modellen), en na **18 weken** (hoog vet dieet), worden bloedsamples verzameld (200µl via v. saphena), en de muizen worden 18 uur in een metabole kooi gehuisvest. Verder worden de volgende non-invasieve vasculaire functie metingen uitgevoerd:
 - Wakkere bloeddruk meting met het CODA tail cuff systeem (Kent scientific).
 - Cardiale functie met ultrasound (Vevo2100, Visual Sonics) (3% isofluraan).
 - Pulse wave velocity (aorta boog) met ultrasound (3% isofluraan).
 - Glycocalyx dikte in het oor met een side-stream darkfield (SDF) camera (3% isofluraan).
 - Renale microcirculatie blood flow met contrast enhanced ultrasound (micro-bubbles) (3% isofluraan).
- Na 24 weken (hoog vet model) of na 18 weeks (DbDb model) wordt er nuchter (4 uur) bloed afgenomen en de volgende dag worden er de volgende invasieve vasculaire functie metingen uitgevoerd, **verder wordt er m.b.v. metabole kooien urine verzameld**:
 - Bloeddruk in de aorta met een tip katheter ingebracht via de femoralis (3% isofluraan).
 - Glycocalyx dikte in de spier van de achterpoot met een side-stream darkfield (SDF) camera (3% isofluraan).
 - Vasculaire reactiviteit van de superior mesenteric artery en de aorta m.b.v. de wire-myograph (DMT, Denmark).
 - Terminale bloed samples en organen worden verzameld voor verdere analyses.

flowchart

C57BL/6j high fed diet mice



DbDb mice



- ↑ Start diet/intervention
- Urine collection
- Fasting blood collection (200μl)
- Non-fasting blood collection (200μl)
- Non-invasieve VF meting (CE-US, SDF ear, tailcuff BP)
- Invasieve VF meting (interarterial BP, SDF muscle, Sacrifice + myograph)

Voor het blok van non-invasieve metingen zal elke muis ca. 2 uur onder narcose zijn (3% isofluraan).

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er zal gebruik worden gemaakt van isofluraan als anesthesie middel. Eerst 3-4% inleiden en dan 2-3% onderhouden.

9b. Pijnbestrijding

De metingen van het hart en bloedvaten zijn non-invasief en de muizen zullen dus geen pijnbestrijding nodig hebben.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Er worden geen zeer ernstige complicaties verwacht bij dit experiment, anders dan bekend van het ziektemodel (matige afwijking mobiliteit en verzorgingstoestand). Indien zich een ziektebeeld ontwikkelt, waarbij de muizen zichtbaar ernstig lijden, zal het experiment voortijdig worden beëindigd, waarbij terminale anesthesie, door middel van verbloeding onder anesthesie plaatsvindt (dit in overleg met de verantwoordelijke onderzoekers).

Als er bij een regelmatige controle een duidelijke verslechtering van de algemene toestand of een gewichtafname van > 20% wordt geconstateerd, zullen de dieren worden geofferd.

Bij eventuele andere problemen, zoals bijvoorbeeld een ontsteking van een wond zal de art. 14 functionaris worden gecontacteerd.

Verder wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen

1. Gedrag
2. Houding
3. Gang/mobiliteit
4. Verzorgingstoestand
5. Voedingstoestand
6. andere in het oog springende afwijkingen

scores: 0= normaal, 1= geringe afwijking, 2= matige afwijking, 3= ernstige afwijking. Bij een score van 3 op een onderdeel of combinatie van scores groter dan 7 zal het dier worden geëuthanaseerd.

Er zal wekelijks een dagboek bijgehouden worden.

10a. Ongerief

De Db/Db en HFD muizen zullen t.g.v. het ziektemodel type 2 diabetes en orgaanschade gaan ontwikkelen. Het ongerief van de dieren zal toenemen met de leeftijd. We schatten het ongerief van de Db/Db muizen in op 01 (gering) bij aanschaf (5 weken oud) dat zal oplopen tot 04 (matig/ernstig) aan het einde van het experiment. Na het overschakelen op het hoog vet dieet zullen de HFD muizen een toenemend ongerief hebben tot 03 (matig) aan het einde van het experiment. Verder kunnen de bijkomende metingen ook additioneel ongerief veroorzaken (zie tabel), hierdoor schatten wij het gesommeerde ongerief in op 04 (matig/ernstig) in alle groepen

	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5
	Ctr	HFD	HFD + Pyri	DbDb	DbDb + Pyri
vasten	2x, 4 uur, ong. 03	2x, 4 uur, ong. 03	2x, 4 uur, ong. 03	2x, 4 uur, ong. 03	2x, 4 uur, ong. 03
bloedafname	5x, 10 min, ong. 03	5x, 10 min, ong. 03	5x, 10 min, ong. 03	4x, 10 min, ong. 03	4x, 10 min, ong. 03
metabole kool	5x, 24 uur, ong. 04	5x, 24 uur, ong. 04	5x, 24 uur, ong. 04	4x, 24 uur, ong. 04	4x, 24 uur, ong. 04
bloeddruk tailcuff	4x, 20 min, ong. 01	4x, 20 min, ong. 01	4x, 20 min, ong. 01	3x, 20 min, ong. 01	3x, 20 min, ong. 01
Inductie anesthesie	5x, 2 uur, ong. 02	5x, 2 uur, ong. 02	5x, 2 uur, ong. 02	4x, 2 uur, ong. 02	4x, 2 uur, ong. 02
Inj. Microbubbles *	4x, 15 min, ong. 01	4x, 15 min, ong. 01	4x, 15 min, ong. 01	3x, 15 min, ong. 01	3x, 15 min, ong. 01
camera op oor *	4x, 15 min, ong. 01	4x, 15 min, ong. 01	4x, 15 min, ong. 01	3x, 15 min, ong. 01	3x, 15 min, ong. 01
bijkomen anesthesie	4x, 15 min, ong. 02	4x, 15 min, ong. 02	4x, 15 min, ong. 02	3x, 15 min, ong. 02	3x, 15 min, ong. 02
ziektemodel	n.v.t.	toenemend tot 03	toenemend tot 03	toenemend van 01 tot 04	toenemend van 01 tot 04
Totale ongerief score	04	04	04	04	04

* De microbubbles worden onder anesthesie geïnjecteerd in de staart, en de SDF camera wordt ook onder anesthesie gebruikt op het oor. Tijdens de meting zal er dus geen ongerief zijn, maar na het bijkomen uit de anesthesie kunnen oor en staart gevoelig zijn (ongerief 01).

10b. Welzijnsevaluatie

Door de diabete status van de dieren zullen de dieren polyurie vertonen waardoor de voeding en het drinkwater vaker gecontroleerd moeten worden. Ook zullen de kooien vaker verschoond moeten worden. Na ontwakking uit de anesthesie (bijkomen in verwarmde ruimte) zullen de muizen extra geobserveerd worden. Er zal verder een dagboek bijgehouden worden, waarbij de algemene status wordt bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

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.

Muizen uit alle groepen ontvangen voeding ter beschikking gesteld door de onderzoeker en hebben onbeperkt toegang tot dit voedsel en water. Het kan zijn dat op hogere leeftijd de DbDb muizen een bakje voer, en drinkwater op gelijk niveau in de kooi moeten krijgen, i.v.m. de zwaarlijvigheid.

Experimenten worden uitgevoerd op het _____ in de _____

12. Deskundigheid

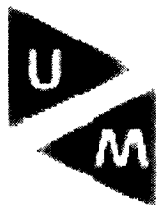
De handelingen met de dieren worden uitgevoerd door de verantwoordelijke onderzoeker in samenwerking met deskundigen van _____ Alle medewerkers zijn hiervoor bevoegd en bekwaam.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

- * Echoscopie van het muizenhart (FAR-02-M)
- * Injectie microbubbles (Vevo MicroMarker™ Non-Targeted Contrast Agent protocol).
(zie ook methods Sullivan et al. 2009)

Relevante literatuur

- * Nichols, Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms, *American journal of hypertension*, 2005.
- * Hartley et al., noninvasive determination of pulse-wave velocity in mice, *ajp heart & physiology*, 1997.
- * Williams et al., noninvasive ultrasonic measurement of regional and local pulse-wave velocity in mice, *ultrasound in Med. & Biol.* 2007.
- * Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 1986:214-216.
- * Sullivan et al., novel use of ultrasound to examine regional blood flow in the mouse kidney, *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009.



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: _____

Uw referentie: _____

Onze referentie: _____

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Non-invasieve imaging van vasculaire functie in muizenmodellen van cardiovasculaire ziekte*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * GGO is niet van toepassing, Graag GGO medewerker van voorblad verwijderen of verplaatsen naar overige uitvoerende.
- * De startdatum op het voorblad is niet juist. Gaarne aanpassen.
- * Punt 7c- De DEC acht de uitval aan de hoge kant en wil graag een onderbouwing hiervoor.
- * De DEC wil graag vermeld zien bij punt 8, hoelang er gevestigd wordt. Dit ook bij het ongerief (10a) vermelden (periode van vasten).
- * Punt 9a- Anesthesie 4-5% inleiden en daarna onderhoudsanesthesie 2-3%.
- * De DEC verzoekt de humane eindpunten meetbaar te definiëren.
- * Punt 10a- De DEC verzoekt de periode van vasten en de bloedafnames toe te voegen en het ongerief per groep te vermelden. De DEC verzoekt een tabel te maken en het ongerief te sommeren.

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 2011-143, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan: Secr. DEC

Postbus 616, PV 14
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 7-11-2011

Geachte leden van de DEC-commissie,

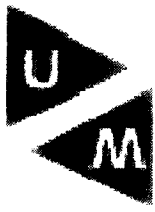
Ik heb uw vragen en opmerkingen m.b.t. tot de nieuwe DEC aanvraag 2011-143 “non-invasieve cardiovasculair imaging in muizen” in goede orde ontvangen. In deze brief zal ik deze zo goed als mogelijk beantwoorden (de aanpassingen in de aanvraag zijn grijs gemarkeerd toegevoegd).

- De GGO medewerker is van het voorblad verwijderd.
- De startdatum op het voorblad is aangepast naar 01-01-2012.
- Rekening houdend met de ernst van het model, en het feit dat de muizen enkele malen onder narcose zullen gaan, hebben wij het uitvalspercentage ingeschat (na overleg met _____ ervaringsdeskundige mbt DbDb muizen en HFD studies) op 25%. Wij geven toe dat dit slechts een inschatting is. Echter blijkt uit eerdere vergelijkbare experimenten van de groep _____ dat 25% reeel is.
- Er zal 4 uur gevast worden, dit is nu vermeld bij punt 8 en opgenomen in de ongerief tabel bij 10a.
- De onderhoudsanesthesie bij punt 9a is veranderd in 2-3%.
- Meetbare definieerbare humane eindpunten zijn nu toegevoegd onder 9c verder is de welzijnsevaluatie onder 10b uitgebreid.
- Bij punt 10a is nu een uitgebreide ongeriefstabel opgenomen.

Verder zou ik graag nog enkele kleine veranderingen willen doorgeven in de aanvraag:

- De 4^{de} non-invasieve meting bij de HFD studie wordt niet na 20 weken, maar na 18 weken gedaan. Dit om één en ander beter te spreiden en aan te passen op de tijdsfasering van de DbDb studie.
- Op het laatste tijdstip (t=24 voor de HFD, en t=18 voor de DbDb muizen), is in de aanvraag abusievelijk de metabole kooi weggevalen uit het protocol. Deze is nu alsnog toegevoegd.

Met vriendelijke groet,



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon: 043-

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 06-03-2012

Geachte Onderzoeker,

De **wijziging**, aangevraagd dd. 17-02-2012, van uw projectaanvraag: "*Non-invasieve imaging van vasculaire functie in muizenmodellen van cardiovasculaire ziekte*", is in de DEC vergadering van 2 maart 2012 besproken.

De DEC heeft één enkele opmerking:

- 1) De DEC verzoekt toe te voegen dat de orbita punctie maximaal 2x uitgevoerd zal worden, onder anesthesie en uitsluitend in overleg met de art.14 functionaris.

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 2011-143, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

I
Voorzitter DEC-UM



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
16-11-2011

Project: Non-invasieve imaging van vasculaire functie in muizenmodellen van cardiovasculaire ziekte.

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

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-143

Diersoort: muis

Aantal dieren: 75

Einddatum: 14-11-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vicevoorzitter DEC-UM