

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Nieuw

DECNR: 2011-026

Ontvangen: 09-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
25-02-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

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

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

Budgetnummer	30370016N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Cryopreservatie en revitalisatie van muizenstammen

startdatum

juli 2011

einddatum⁹

juli 2015

Duur van de proef¹⁰: 8 weken / jr

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	CPV
2. Vervanger VO (VVO)					
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden	Medewerkers CPV			Art.12	CPV
5.					

Diergroep	1	2	3				
ctrl/exp/sham			Gevasectomeerde				
Diersoort	muis	muis	muis				
Stam							
Construct / mutatie ?							
Herkomst (leverancier) *	01	01	01				
Aantal	2000	400	100				
Geslacht	V	m	m				
Dieren immuuncompetent ?	Ja	ja	ja	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸	ja/nec ⁸
Leeftijd/gewicht	15g	geslachtsrijp	geslachtsrijp				
Doel van de proef *	37	37	37				
Belang van de proef *	01	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01				
Bijzondere technieken *	01	01	01				
Anesthesie *	04	01	04				
Pijnbestrijding *	04	01	04				
Mate ongerief *	02	01	02				
Toestand dier einde exp*	01	02	02				

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)
Titel: Cryopreservatie en revitalisatie van muizenstammen

1. Doel van de proef.

In het kader van verfijning en vermindering bij het fokken en transport van genetisch gemodificeerde muizen, willen we overgaan op het cryopreserveren van muizenstammen die worden aangehouden in de fok van het CPV. Daarnaast willen we onderzoekers de mogelijkheid bieden om embryo's te importeren en te revitaliseren. Dit met oog op enerzijds het voorkomen van transportstress bij levende dieren en daarnaast om het risico op insleep van ongewenste knaagdierpathogenen bij introductie van een nieuwe muizenstam binnen de instelling te beperken.

DOEL:

1. cryopreserveren van muizenstammen
2. revitaliseren van muizenstammen
3. importeren van muizenstammen

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Transgene muizen worden gecreëerd en gefokt voor het gebruik in dierexperimenteel onderzoek. Het maatschappelijk en of wetenschappelijk belang voor het creëren van een nieuwe transgene lijn wordt op voorhand beoordeeld en afgewogen door de DEC. Het maatschappelijk en of wetenschappelijk belang voor het uitvoeren van dierexperimenteel onderzoek met (transgene) muizen wordt op voorhand beoordeeld en afgewogen door de DEC. Voorafgaand aan het opstarten van een fok binnen het CPV dient de onderzoeker de noodzaak voor het fokken van de dieren te kunnen aangeven. Het aanleggen van een back-up van muizenlijnen (door cryopreservatie) die niet elders verkrijgbaar zijn, kan voorkomen dat een stam en daarmee wetenschappelijke informatie verloren gaat ten gevolge van genetische drift, ziekten of natuurlijke rampen.

Daarnaast moet cryopreservatie bijdragen tot een vermindering van proefdiergebruik door onnodige fok van dieren te beperken, door stammen in stand te houden die op het moment niet of zeer sporadisch gebruikt worden voor onderzoek binnen de instelling en elders niet verkrijgbaar zijn.

3. Alternatieven

Alternatieven om waardevolle muizenlijnen in stand te houden zijn beperkt: fokken, cryopreserveren van embryo's, sperma of ovariaweefsel. Fokken van genetisch gemodificeerde muizen kan gepaard gaan met ongerief en resulteert vaak in de productie van een groot aantal overtollige dieren. Cryopreservatie levert een bijdrage in de vermindering en mogelijk verfijning (in geval van het fokken van transgene muizen met ongerief) van proefdiergebruik. Binnen de procedure zelf zal er gestreefd worden om het welzijn van de dieren te bewaken door geen gebruik te maken van te jonge dieren, te letten op het gewicht van de mannelijke dieren in verhouding tot de vrouwelijke muizen, aandacht te besteden aan nieuwe ontwikkelingen die het succespercentage van de embryo-opbrengst en de invries/ontdooi procedure te verbeteren en het introduceren van nieuwe technieken waardoor het aantal gebruikte dieren verminderd kan worden.

Het transport van ingevroren materiaal zoals embryo's of sperma op zich wordt gezien als een verfijning t.o.v. het transport van levende dieren.

4. Ethische afweging

Cryopreservatie wordt gebruikt om een back-up aan te maken van al dan niet genetische gemodificeerd muizenlijnen die op het moment niet of zeer sporadisch gebruikt worden binnen de instelling voor onderzoek en om stammen te beschermen tegen genetische drift, ziekten en natuurlijke rampen.

Transport van muizenlijnen i.v.v. gecryopreserveerde embryo's of sperma voorkomt gezondheids- en welzijnsproblemen die vaak optreden bij transport van levende dieren.

Hoewel de techniek moet bijdragen tot een verantwoord proefdiergebruik in het kader van vermindering en verfijning, kost het ook proefdieren om een stam te cryopreserveren. De procedure op zich kan gepaard gaan met ongerief voor de dieren die hierbij betrokken worden. Al het nodige zal gedaan worden om dit te beperken. Wij vinden dat de voordelen van het toepassen van deze techniek opwegen t.o.v. het ongerief voor de dieren.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Cryopreservatie kan een belangrijke rol spelen in het management van een fokkolonie en in daarmee geassocieerde wetenschappelijke programma's. Veel transgene lijnen worden slechts sporadisch gebruikt voor onderzoek en het in stand houden ervan door continu te fokken resulteert in de productie van surplus dieren. Cryopreservatie biedt een alternatieve mogelijkheid om transgene lijnen te bewaren. Daarnaast vormt het een strategische reserve in geval van het optreden van genetische drift, pathogene infecties en natuurlijke rampen.

Cryopreservatie kan via verschillende technieken uitgevoerd worden. De muizenembryo's kunnen op een snelle (vitrificatie) of via langzame (slow freezing) methode ingevroren worden. Tegenwoordig wordt voor het verkrijgen van de muizenembryo's geassisteerde technieken gebruikt. Een goed beschreven techniek is de in vitro fertilisatie. De opbrengst van de embryo's is bij in vitro fertilisatie hoger wat resulteert in minder gebruik van embryodonoren.

Een nieuwe ontwikkeling in de wereld van cryopreservatie is het invriezen van muizensperma. Deze techniek is recent geoptimaliseerd waardoor het mogelijk is om met 2 mannelijke muizen een lijn te bewaren. Deze techniek kan alleen toegepast kan worden voor het cryopreserveren van heterozygote stammen.

Cryopreservatie kan ook gebruikt worden om potentiële logistieke problemen en gezondheids- en welzijnsproblemen bij transport van levende dieren te voorkomen. Technieken voor cryopreservatie en revitaliseren zijn goed beschreven. Voordat de fok van een transgene lijn wordt beëindigd wordt de vitaliteit van de ingevroren embryo's of sperma bepaald. Bij revitalisatie van ingevroren embryo's of sperma afkomstig van een ander instelling, zal na het spenen van de pups, de draagmoeder naar een erkend diagnostisch laboratorium getransporteerd worden voor een microbiologische controle.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit onderzoeksplan is beoordeeld en akkoord bevonden door het hoofd van de afdeling CPV.

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Muis, afkomstig uit de fok van het CPV of aangekocht van een geregistreerd fokbedrijf.

Voor de superovulatie worden vrouwelijke muizen van minstens 15gr gebruikt.

Dekmannen zijn minstens 8 weken oud en liefst jonger dan 6 maanden.

Draagmoeders moeten minstens 20gr wegen. In geval van revitalisering van een lijn, worden de draagmoeders na het volbrengen van de zwangerschap als verklikkers opgestuurd naar een erkend diagnostisch laboratorium voor microbiologische screening.

Voor de steriele dekmannen kunnen gevasectomeerde dekmannen gebruikt worden van minstens 8 weken oud en liefst jonger dan 6 maanden of er kunnen genetische steriel dekmannen gebruikt worden van minstens 8 weken oud (vb. T145 muizenstam verkrijgbaar bij een geregistreerd fokbedrijf).

De embryodonoren worden geëuthaniseerd in het experiment. De overige dieren worden indien mogelijk hergebruikt.

7b. Sexe

Man en vrouw

7.c. Aantallen

Alle dieren die gebruikt worden voor boven beschreven doelen worden geregistreerd in de computerdatabase van het dierenlab.

- embryodonoren voor cryopreservatie: meestal volstaan 300 tot 500 embryo's als back-up voor een GM lijn. Het aantal embryo's geproduceerd na superovulatie varieert van stam tot stam. Bij hybride stammen zoals (C57Bl/6xCBA)F1 is het mogelijk om tot 30 embryo's te verkrijgen. Het nadeel van het gebruik van deze dieren is dat er achteraf een fokprogramma moet opgezet worden om terug te kruisen naar de juiste achtergrond. De inteeltlijnen zoals C57Bl/6, FVB/N, BALB/c hebben een lager embryo-opbrengst na superovulatie. We gaan er van uit dat we 30-50 vrouwtjes nodig hebben om voldoende embryo's te kunnen cryopreserveren van één GM lijn. Het cryopreserveren van één GM lijn duurt ongeveer 5 weken. Op jaarbasis is het mogelijk om 10 GM lijnen te cryopreserveren met maximaal 500 embryodonoren.
- Embryodonoren voor IVF: Door de toepassing van in vitro fertilisatie zal de netto opbrengst van de embryo's hoger zijn. In de literatuur¹ staat beschreven dat C57Bl/6 muis na superovulatie gemiddeld 20 eicellen heeft. In ideale condities ontwikkelt 80% van deze eicellen tot embryo's. Dit wil zeggen dat we ongeveer 20 tot 30 vrouwtjes nodig hebben om 300 tot 500 embryo's van één GM lijn te cryopreserveren.
- (GM) dekmannen: worden 1op1 bij een vrouwtje geplaatst. Uit de praktijk ervaring van cryopreservatie (DEC2007-052) blijkt dat bij 2 vrouwtjes en 1 man de plugopbrengst beduidend lager is. De beste resultaten worden verkregen bij gebruik van maximaal 10 dekmannen. Het dekken op zich wordt voor de man niet gezien als een dierproef.
- Draagmoeders en steriele dekmannen: bepaling van het aantal muizen is gebaseerd op de literatuur¹. Doorgaans volstaan twee schijnzwanger draagmoeders voor de revitalisatie van één GM stam. Uit ervaring blijkt dat 1/4 van de steriele dekmannen copuleert met de draagmoeders. Het revitaliseren moet dus haalbaar zijn met maximaal 10 steriele dekmannen met maximaal 10 draagmoeders.

De eerste generatie pups hiervan wordt gecontroleerd of ze zich normaal ontwikkelen. De gebruikte (referentie: *Manipulating the Mouse Embryo*² a laboratory manual by Andras Nagy, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten, Richard Behringer) aantallen worden voor elke opdrachtgever (VO) per aanvraag bijgehouden.

5 Dierproef

8. Experiment

De uitvoering van de cryopreservatie procedure, superovulatie procedure, revitalisatie procedure en de vasectomie procedure staat beschreven in geregistreerde SOP's

- SOP: superovulatie bij muizen
- SOP: cryopreservatie via slow freezeing
- SOP: vitrificatie van muizenembryo's
- SOP: revitalisatie via oviducttransfer
- SOP: revitalisatie via uterustransfer
- SOP: In vitro fertilisatie bij muizen
- SOP: vasectomie

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie gebeurt enkel bij deze muizen die een operatieve ingreep ondergaan. Indien de apparatuur aanwezig is voor inhalatie anesthesie wordt deze bij voorkeur gebruikt anders wordt injectie anesthesie toegepast. Voor de keuze en de wijze van toediening van het gebruikte anesthesiemiddel wordt gekeken naar het welzijn van het dier rekeninghoudend met de eventuele bijwerkingen of de mogelijkheid bestaat voor het toedienen van een antidotum.

vb. combinatiepreparaat Ketamine met Medetomidine (toediening: 75mg/kg Ketamine met 1mg/kg Medetomidine, sc of ip injectie). Er bestaan een antidotum voor Medetomidine, hierdoor kan de werking opgeheven worden en zal de muis sneller ontwaken.

Wanneer de muis onder anesthesie is, zal een oogzalf gebruikt worden om uitdroging van de ogen te voorkomen.

9b. Pijnbestrijding

Pijnbestrijding vindt plaats o.v.v. subcutane toediening van een NSAID voor en 1 dag na de operatieve ingreep. De werkingsduur is afhankelijk van het gebruikt NSAID. Bij voorkeur wordt een NSAID eenmalig toegediend met een werkingsduur van 24uur.

vb. carprofen: toediening 5mg/kg, sc injectie

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Bij de embryodonoren gebeurt de euthanasie d.m.v. cervicale dislocatie onder sedatie. De overige dieren worden enkel geëuthaniseerd als ze verder niet hergebruikt kunnen worden voor een ander experiment. Dit gebeurt door een vakbekwame CPV medewerker middels overdosis isofluraan of middels CO₂/ O₂.

De operatieve ingreep gebeurt aseptisch. Er worden in principe geen complicaties verwacht t.g.v. de ingreep of de injecties. Mochten er toch dieren ziek worden of zich abnormaal gedragen dan wordt er contact opgenomen met de art14 functionaris. Het welzijn wordt dagelijks gecontroleerd. Er wordt gelet op algemene indruk, houding, verzorging en gedrag. De dieren worden de eerste dagen na de operatie gewogen. De bevindingen worden bijgehouden in het welzijnsdagboek.

10a. Ongerief

Bij de cryopreservatie: het te verwachten ongerief voor de vrouwelijke embryodonoren t.g.v. injectie met hormonen is 02. De embryodonoren worden twee keer intraperitoneaal geïnjecteerd met een verdunde hormoonoplossing. Er is een periode van 1 dag tussen de twee injecties. Het ongerief t.g.v. de euthanasie is code 02.

Bij de revitalisatie: het te verwachten ongerief voor de draagmoeders die operatief zwanger gemaakt worden, wordt ingeschat op code 02. De draagmoeder wordt eenmaal subcutaan geïnjecteerd met de anesthesieoplossing. Wanneer de muis onder volledige narcose is, wordt de injectie voor de pijnbestrijding subcutaan toegediend en worden de embryo's teruggeplaatst. De ingreep duurt ongeveer 30 minuten.

De gevasectomeerde mannelijke muizen kunnen aangekocht worden bij een commercieel geregistreerd fokbedrijf of mannelijke muizen kunnen gevasectomeerd worden door een bekwame CPV medewerker. Het ongerief t.g.v. de vasectomie wordt ingeschat op 02. De muis wordt eerst onder narcose gebracht door eenmalige subcutane injectie vooraleer de ingreep wordt uitgevoerd. De ingreep duurt ongeveer 30 minuten.

	aard	frequentie	duur	Verwacht ongerief
embryodonoren	ip injectie	2x	20sec	02
draagmoeder	sc injectie anesthesie	1x	20sec	01
	embryotransfer	1x	± 30min	02
gevasectomeerde dekmans	sc injectie anesthesie	1x	20sec	01
	vasectomie	1x	± 30min	02

10b. Welzijnsevaluatie

Na de evaluatie van het welzijn van de muizen gebruikt voor de cryopreservatie (DEC2007/052) besluiten we dat het verwachte ongerief overeenkomt met het werkelijke ongerief. Er zijn geen ernstige afwijkingen gezien bij de muizen. Bij één muis (van de 500 muizen) is er een inwendige bloeding opgetreden door de ip injectie.

11. Verzorging en huisvesting

De embryodonoren worden bij voorkeur sociaal gehuisvest in IVC.

Voor de paring met de embryodonoren worden de dekmannen bij voorkeur sociaal gehuisvest in IVC. Eens als de dekmannen gepaard hebben worden ze individueel gehuisvest om onderlinge gevechten te voorkomen.

De draagmoeders worden bij voorkeur sociaal gehuisvest in IVC. Wanneer meerdere draagmoeders een embryotransfer ondergaan worden deze draagmoeders samen gehuisvest tot ongeveer één week voor de verwachte werpdatum.

De verzorging en de registratie van het welzijn gebeurt door gekwalificeerd personeel van het CPV.

12. Deskundigheid

Alle handelingen worden uitgevoerd door bevoegd en bekwame medewerkers van het CPV.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

- SOP: superovulatie bij muizen
- SOP: cryopreservatie via slow freezeing
- SOP: vitrificatie van muizenembryo's
- SOP: revitalisatie via oviducttransfer
- SOP: revitalisatie via uterustransfer
- SOP: In vitro fertilisatie bij muizen

- SOP: vasectomie

Deze SOP's worden geregistreerd en zijn terug te vinden op de CPV website.

Relevante literatuur

Boek: "Manipulating the Mouse Embryo" a laboratory manual by Andras Nagy, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten, Richard Behringer

Protocol 1: Intraperitoneaal (IP) injectie bij muizen**Doel**

IP injectie wordt toegepast voor de toediening van bepaalde stoffen (bv hormonen) in de buikholte van een muis. Er treedt een snellere resorptie van de ingespoten stof op in het peritoneum.

Materialen**Dieren:**

Muis

Uitrusting:

steriele hypodermische 26- of 30- gauge
naald, ½ inch (voor jongere dieren is een
smallere naald aangewezen)
steriele 1-3ml spuit, wegwerpbaar

Reagentia:

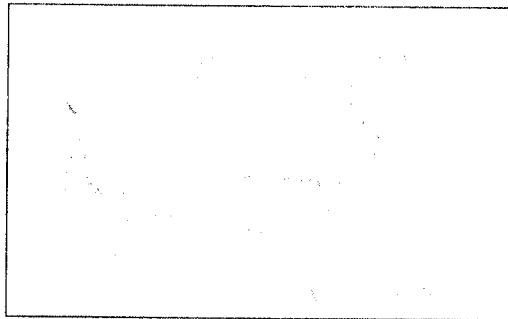
In te spuiten vloeistof

Uitvoering

- trek met een steriele spuit de gewenste hoeveelheid oplossing op zonder luchtballen
- zorg dat de ingespoten oplossing een kamertemperatuur heeft, injectie van koude oplossingen is pijnlijker.
- neem de muis vast aan de staart met de rechterhand en plaats de muis op de rooster van de kooi zodat de muis zich met de voorpoten vasthoudt.
- fixeër de muis door het nekvel zo dicht mogelijk aan de oren vast te nemen en pak de muis los van de rooster
- zorg ervoor dat je genoeg nekvel neemt zodat de muis zijn kop niet kan draaien en jou kan bijten
- houd de staart vast met je pink
- houd de muis met de kop naar beneden zodat je geen inwendige organen beschadigt door de injectie
- prik de muis in de buikholte met de naald naast de mediaanlijn, in de linkerflank van de muis

Centrale Proefdier Voorziening
Universiteit Maastricht

- de naald mag niet te horizontaal worden ingebracht (schuift tussen buikwand en huid in) en niet te verticaal (aanprikken van de nier)
- gebruik een zo kort mogelijke naald. Hierdoor zal er minder snel beschadiging van de inwendige organen ontstaan.
- injecteer langzaam de oplossing in de muis (*zie figuur 1.1: ip injectie bij de muis*)
- wacht even vooraleer je de naald terugtrekt uit de muis. Hierdoor verkleint de kans op terugvloeiing van de injectievloeistof.
- zet de muis rustig in de kooi



Figuur 1: Intraperitoneaal (IP) injectie bij een muis

Verwerking van de resultaten

De toediening van de ip injecties worden genoteerd in het welzijnsdagboek van de muizen. Er wordt duidelijk vermeld:

- uitvoerder
- datum
- diernummer
- ongeriefscore

Protocol 5: Superovulatie bij muizen

Doel

Voor het superovuleren van muizen worden de hormonen Folligonan[®] en Chorulon[®] toegediend. Deze hormonen zorgen voor het synchroniseren van de ovulatie en het verkrijgen van een groot aantal embryo's.

Materialen

Dieren:
vrouwelijke muis, 3 tot 5 weken oud
mannelijke muis, ouder dan 6 weken
Uitrusting:
steriele 50 ml falconbuis
flaconbuis houder
steriele 1,5ml ebjes, geel
steriele 1,5ml ebjes, rood
steriele pipetpunten 1ml
pipetman 1ml
pipetboy
steriele gegradueerde pipet 20ml
gele opbergdoos voor gele ebjes
rode opbergdoos voor rode ebjes
steriel hypodermische 26/30-gauge naald, ½inch
steriel 1ml spuit, wegwerpbaar
Reagentia
NaCl 0,9%
Folligonan (1000IU)
Chorulon (1500IU)

Uitvoering

1. Bereiding van Folligonan:

- Folligonan is afkomstig van Elke ampul bevat 1000 IU Folligonan in gevriesdroogde poedervorm. Het solvent wordt afzonderlijk bijgeleverd
- werkoplossing van Folligonan (50IU/ml):
 - pipetteer 19 ml steriel 0,9% NaCl af in een steriele 50 ml falconbuis
 - voeg met een pipet 1 ml steriel 0,9% NaCl in de ampul met Folligonan (in poedervorm)
 - meng voorzichtig het geheel totdat het poeder oplost

- pipetteer deze hormoonoplossing uit de ampul en voeg toe aan 19 ml steriel 0,9% NaCl in de 50 ml falconbuis
- spoel de ampul 3x met de verdunde hormoonoplossing
- zorg dat de hormoonoplossing homogeen verdeeld is door voorzichtig te mengen
- pipetteer 600 µl hormoonoplossing in een steriel gele ebye
- Bewaar deze gele ebjes in de gele doos in de diepvriezer -20°C

werkoplossing: 1000 IU in 20 ml NaCl 0,9%	→ 50 IU/ml
uitverdelen in 600 µl / ebye	→ bewaren in -20°C
finale concentratie ip : 100 µl Folligonan / muis	→ 5 IU/ml
1 geel ebye bevat 600 µl Folligonan → 100 µl ip injectie voor 5 muizen	

2. Bereiding van Chorulon:

- Chorulon is afkomstig van Elke ampul bevat 1500 IU Chorulon in gevriesdroogde poedervorm. Het solvent wordt afzonderlijk bijgeleverd.
- werkoplossing van Chorulon (50IU/ml):
 - meet 29 ml steriel 0,9% NaCl af in een steriele 50 ml falconbuis
 - voeg met een pipet 1 ml steriel 0,9% NaCl in de ampul met Chorulon (in poedervorm)
 - meng voorzichtig het geheel totdat het poeder oplost
 - pipetteer deze hormoonoplossing uit de ampul en voeg ze toe aan 29 ml steriel 0,9% NaCl in de 50 ml falconbuis
 - spoel de ampul 3x met de verdunde hormoonoplossing
 - zorg dat de hormoonoplossing homogeen verdeeld is door voorzichtig te mengen
 - pipetteer 600 µl hormoonoplossing in een steriel [REDACTED]
 - bewaar deze rode ebjes in de [REDACTED] in de diepvriezer -20°C

werkoplossing: 1500 IU in 30 ml NaCl 0,9%	→ 50 IU/ml
uitverdelen in 600 µl / ebye	→ bewaren in -20°C
finale concentratie ip : 100 µl Chorulon / muis	→ 5 IU/ml
1 geel ebye bevat 600 µl Chorulon → 100 µl ip injectie voor 5 muizen	

3. Toediening hormonen

De hormonen worden toegediend aan jonge vrouwelijke muizen door een intraperitoneale injectie (zie protocol: ip injectie) volgens een bepaald schema. Het tijdstip van toediening van de hormonen bepaald het ontwikkelingsstadia van de embryo's.

- op dag -3: 100 µl ip injectie met Folligonan in concentratie van 5IU/ml
- op dag -1: 100 µl ip injectie met Chorulon in concentratie van 5IU/ml
vrouwelijke muis wordt samen gezet met een mannelijke muis
- op dag 0: vindt de paring plaats
- op dag 0,5: controle aanwezigheid van een plug
- op dag 2,5: opoffering muis voor isolatie embryo's

Dag -3	Dag -1	Dag 0,5	Dag 2,5
Folligonan 100 µl	Chorulon 100 µl	plug controle	isolatie embryo's

Verwerking resultaten

De bereiding van de hormonen worden elke genoteerd in het labschrift. Er wordt duidelijk vermeld:

- uitvoerder
- datum
- werkwijze

De toediening van de ip injecties worden genoteerd in het welzijnsdagboek van de muizen. Er wordt duidelijk vermeld:

- uitvoerder
- datum
- diernummer
- ongeriefscore

Protocol 3: Isolatie van muizenembryo's

Doel

Na de paring bevinden de muizenembryo's zich naargelang het ontwikkelingsstadium in de oviduct of uterus van een vrouwelijke drachtige muis. Voor de isolatie van de muizenembryo's worden de vrouwelijke voortplantingsorganen verwijderd uit het lichaam van de muis. Door het spoelen van de uterus en de oviduct met media komen de embryo's vrij. De embryo's worden gecollecteerd, gesorteerd en gewassen in media. Na de wasstappen worden de embryo's gecryopreserveerd voor bewaring of teruggeplaatst in een pseudodrachtige fostermuis.

Materialen

Dieren:

Vrouwelijke zwangere muis tussen 3-5 weken oud

Uitrusting:

kleenex doekjes

steriel operatie instrumenten:

- grote pincet
- kleinere pincet met gebogen punt
- watchmaker #5 pincet met gebogen punt
- watchmaker #5 pincet
- zeer fijne schaar
- grotere chirurgische schaar

steriele 14ml falconbuis

steriele 0,22µm filter

steriele 1ml spuit, wegwerpbaar

steriele 2ml spuit, wegwerpbaar

steriele 20ml spuit, wegwerpbaar

steriele hypodermische 27G naald

hamiltonnaald

steriele kleine petrischalen (35x10mm)

steriele grote petrischalen (60x10mm)

pipet voor embryohandelingen

stereomicroscoop

CO₂ incubator

Reagentia:

Ethanol, 70%

M2 media

100x Penicilline/streptomycine oplossing

Uitvoering

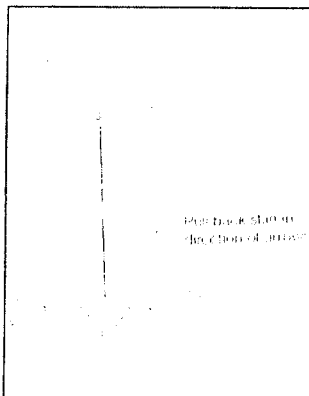
1. Bereiding oplossingen:

- 100x Penicilline/Streptomycine oplossing
 - laat de oplossing ontdooien
 - verdeel 0,7 ml van de oplossing in een steriel ebe
 - bewaar op -20 °C
- M2 medium
 - 0,5 ml M2 verwijderen uit de 50ml fles
 - 0,5 ml 100x Penicilline/streptomycine oplossing toevoegen aan fles M2
 - lichtjes mengen
 - filtreer het M2 medium doorheen een 0,22µm filter mbv een steriele 20 ml spuit in steriele 14ml falconbuis
 - bewaar max. 1 week op 4 °C

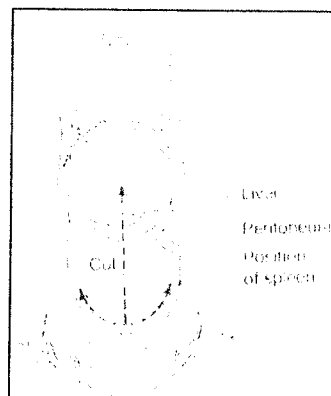
2. Dissectie van vrouwelijke zwangere muis:

- plaats de muis op de ruif van de kooi
 - offer de muis op door cervicale dislocatie.
 - leg de muis op zijn rug op een absorberend papier
 - bespuit de muis met 70% alcohol (EtOH). Deze stap is belangrijk om het risico op contaminatie met muizenhaar te verminderen tijdens de dissectie.
 - neem met een steriel grote pincet de huid van de muis vast in de onderste regio van de buik en til het lichtjes op
 - maak in deze regio een laterale incisie met een chirurgische schaar. (*zie figuur 1.1*)
 - scalpeer de muis door stevig aan de huid te trekken onder de incisie richting de kop en boven de incisie richting de staart totdat het abdomen volledig zichtbaar is (*zie figuur 1.2*)
- deze stap kan vervangen worden door het openknippen van het abdomen mbv een chirurgische schaar.
- neem met een steriele kleinere pincet het peritoneum vast en til het lichtjes op

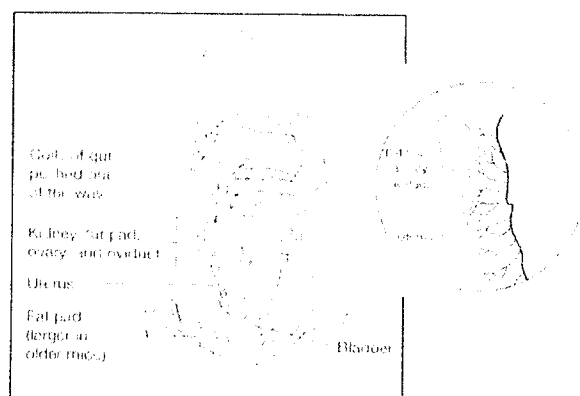
- maak met een klein schaartje een knip in het peritoneum en knip vervolgens omhoog en lateraal zodat er een V-vormige flap ontstaat die naar boven wordt geklapt
- duw de ingewanden voorzichtig aan de kant
- lokaliseer de uterushoorn met daaraan het oviduct aan beide zijden van de muis (zie *figuur 1.3*)



Figuur 1.1: incisie



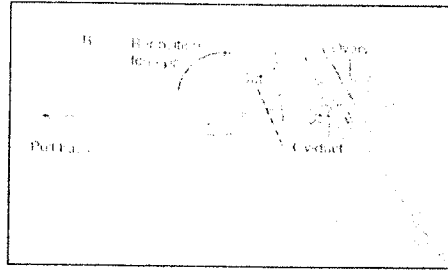
Figuur 1.2: scalperen



Figuur 1.3: lokalisatie ingewanden

3. Lokaliseren en verwijderen van oviduct:

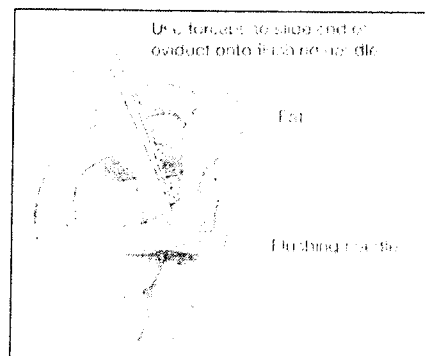
- neem met een pincet de uterus voorzichtig vast en trek deze voorzichtig omhoog
- verwijder het mesometrium en het vet door met een pincet voorzichtig aan het mesometrium te trekken
- zorg dat er zo veel mogelijk vet verwijderd is aan het uterus
- fixeër de uterus door een schaar onder de uterus te plaatsen ter hoogte van het pincet en laat de uterus rusten op de schaar
- herpak de uterus door het pincet te herplaatsen dat de punt van pincet bovenuiteinde van een uterushoorn juist naast het oviduct vasthoudt
- verwijder het oviduct door een eerste knip tussen het oviduct en de uterus en de tweede knip achter het pincet, in de uterus (zie *figuur 2*)
- plaats het uitgeknipte oviduct in een petrischaal met M2 media op kamertemperatuur
- herhaal de procedure voor het andere oviduct



Figuur 2: pincetpositie

4. Isolatie embryo's uit oviduct:

- vul een steriele 1 ml spuit met M2 zonder luchtbelletjes en plaats de Hamiltonnaald erop
- leg een petrischaal onder de stereomicroscop
- breng met een pincet het oviduct op een petrischaal
- lokaliseer het infundibulum, het begin van het oviduct.
- fixeër het infundibulum met een pincet
- ga met Hamiltonnaald in het infundibulum tot de eerste buiging
- duw met de Hamiltonnaald het infundibulum tegen de bodem van petrischaal
- werk voorzichtig zodat het infundibulum niet stuk gaat
- spoel het infundibulum door met ongeveer 0.1ml M2 (zie *figuur 3*). Het oviduct gaat hierdoor opzwellen.
- leg het doorgespoelde oviduct aan de kant
- herhaal de procedure voor de andere oviducten



Figuur 3: spoelen oviduct

5. Collecteren, sorteren en wassen embryo's:

- neem een petrischaal met daarin enkele druppels M2

- vul de embryopipet met M2
- verzamel alle embryo's uit het geflushed M2 media
- breng de embryo's over in druppel vers M2
- controleer de embryo's op beschadiging of degeneratie
- collecteer alleen de goede embryo's (intacte ZP, geen beschadigde blastomeren) zonder vuil mee te nemen
- was de embryo's door de embryo's 5x over te brengen in nieuw druppel M2
- gebruik bij elke wasstap een nieuw pipet
- laat de embryo's in de laatste druppel M2 zitten totdat ze gebruikt worden voor de cryopreservatie of revitalisatie



Figuur 4: ontwikkeling van een eicel tot een morula



Figuur 5: gefragmenteerde embryo's

Verwerking van de resultaten

De resultaten worden verwerkt op het protocolblad "Slow freezing".

Protocol 6: Cryopreservatie via slow freezing

Doel

Om muizenembryo's langdurige te bewaren, worden de embryo's gecryopreserveerd in vloeibare stikstof. Cryopreservatie van muizenembryo's gebeurt volgens het principe van "Slow freezing". De embryo's worden blootgesteld aan een matige concentratie cryoprotectant. De temperatuur koelt geleidelijk af (0.2-2.0°C/minuut) tot onder de nul (-30°C) door middel van een temperatuur gecontroleerde invriestoestel. Ten slotte worden de embryo's in vloeibare stikstof bewaard.

Materialen

Uitrusting:

steriel falconbuis 50ml
steriele pipetpunten 1ml
pipetman 1ml
membraanfilter 22µm
steriele kleine petrischaal, 35x10mm
embryo pipet
invriesrietje, 0.25ml 133mm lengte
identificatiestick-etiket
permanente markeerpen
metalen staafje
meetlat
chronometer
cristaseal
voorraadvat
grote pincet
veiligheidsbril en handschoenen

Reagentia:

sucrose
PROH oplossing
M2 media

Toestellen:

Julabo FP50-HL invriestoestel

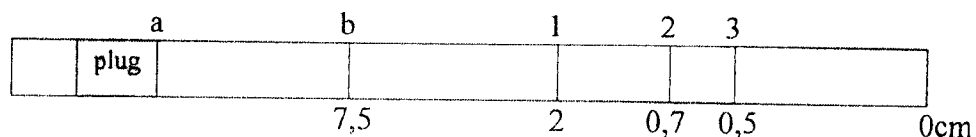
Uitvoering

1. Bereiding oplossingen:

- Cryoprotectant 1,5M PROH
 - pipetteer 0,6 ml PROH (=0,57g) in een steriele 50 ml falconbuis
 - voeg 4,4 ml M2 toe
 - filtreer doorheen een 0,22µm filter mbv een steriele 20 ml spuit in steriele 14 ml falconbuis
 - verwijder na 7 dagen bewaring
- Verdunningsoplossing 1M sucrose
 - weeg 1,71g sucrose in een steriel 50 ml falconbuis
 - voeg 5ml M2 toe
 - filtreer doorheen een 0,22µm filter mbv een steriele 20 ml spuit in steriele 14 ml falconbuis
 - bewaar op max. 1 week op 4 °C

2. Cryopreservatie via slow-freezing

- vul een voorraadvat met vloeibare stikstof gehaald bij
- zet het invriestoestel aan
- instaleer programma 1 zodat de temperatuur kan afkoelen tot -7°C
- pipetteer 150µl PROH in het midden van een petrischaal (35x10mm)
- collecteer de niet gefragmenteerd embryo's in M2 op kamertemperatuur
- verdeel ongeveer 20-25 embryo's in 150µl PROH
- laat de embryo's gedurende 15 minuten equilibreren op kamertemperatuur
- maak ondertussen de invriesrietjes klaar als volgt:
 - neem een invriesrietje 0,25 ml
 - markeer het rietje met een stift als volgt:



- verplaats de katoenenplug van plaats a naar b mbv een metalen staafje



- plak het etiket juist voor de plug
- vul het rietje als volgt:
 - zuig sucrose op tot streep 3
 - zuig lucht op tot streep 2
 - zuig PROH op tot streep 1
 - zuig lucht op tot de katoenen plug verkleurd door de sucrose

etiket	plug	sucrose	lucht	ProH embryo's	lucht	
--------	------	---------	-------	------------------	-------	--

- laad de embryopipet met PROH gevolgd met 2 luchtbellens op het einde van de pipet
- zuig de 20 tot 25 embryo's in de pipet met zo weinig mogelijk PROH
- maak een luchtbel op het einde van de pipet
- ga voorzichtig met de punt van de embryopipet in het invriesrietjes tot in de fractie PROH
- blaas voorzichtig de embryo's met de luchtbellens in de fractie PROH
- verwijder de embryopipet uit het invriesrietje
- dicht het invriesrietje met "Cristaseal"
- plaats het invriesrietjes in de houder van het invriestoestel (starttemperatuur: -7°C)
- wacht 5 minuten (op -7°C) voor equilibratie
- dompel een pincet in vloeibare stikstof, aanwezig in het voorraadvat
- "seed" het invriesrietje door de sucrose fractie aan de plugzijde van het rietjes aan te raken met bevroren punten van een pincet
- wacht totdat seeding in heel het rietje optreedt
- start het programma (afkoeling tot op -7°C met 0,3°C/min of 0,5°C/min)
- Bij -30°C: plaats de invriesrietjes vlug in vloeibare stikstof
- breng de invriesrietjes in het voorraadvat naai

Verwerking van de resultaten

De resultaten worden genoteerd op het protocolblad "slow freezing"

Protocol 7: *In vitro* fertilisatie

Doel

Bij het uitvoeren van de techniek *in vitro* fertilisatie bevrucht men kunstmatig mature eicellen met sperma in een petrischaal.

Na superovulatie van de vrouwelijke muizen kan men de eicellen verwijderen. Het vers sperma wordt verkregen uit de cauda epididymides van een mannelijke muis. Men kan eventueel ingevroren sperma gebruiken. De ontwikkelde embryo's zijn tweecellig die men cryopreserveert via de methode van slow-freezing.

Per IVF sessie krijgt men meer dan 100 nakomelingen. In enkele IVF sessies bereikt men het aantal embryo's nodig voor de cryopreservatie.

Materialen

Dieren:

- Vrouwelijke muizen (3-5 weken)
- Mannelijke muizen (>8weken)

Uitrusting:

- steriel kleenex papier
- steriele falconbuis 50ml
- steriel falconbuis 14ml
- 0,22µm filter
- steriele spuit 50ml
- steriele petrischaal 35mm
- embryo pipet
- steriele kleine petrischaal (35x10mm)
- steriele grote petrischaal (60x10mm)
- steriele pipetpunten, wijde opening
- steriele pipetpunten, 1ml
- pipetman 250 µl
- pipetman 1ml
- steriele operatie instrumenten:
 - grote schaar
 - kleine schaar
 - grote pincet
 - watchmaker # 5 pincet
- lichtbron
- stereomicroscop
- warmteplaatje
- CO₂ incubator

Reagentia:

Human Tubal Fluid (HTF)
Albumin from bovine serum (BSA)
minerale olie
EtOH 70%

Uitvoering

Tijdschema IVF:

Dag -3	Dag -1	Dag 0	Dag 1
18:00 ip injectie PMS (5IU)	preparatie petrischalen met media	7:00 collecteren vers sperma	9:00 score IVF
	18:00 ip injectie hCG (5IU)	8:00 – 9:00 collecteren oöcyten	10:00 cryopreservatie
		15:00 wassen oöcyten	2cellige embryo's

Dag -1:

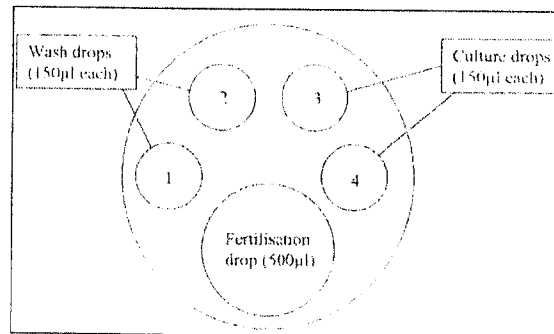
1. **Bereiding oplossingen**

- Human Tubal Fluid (HTF) met Gentamycine wordt verkregen in flessen van 500ml van
 - ontdooid 1x HTF (25ml fles)
 - voeg 0,1g BSA toe aan HTF
 - laat BSA oplossen zonder te schudden
 - filtreer HTF doorheen 0,22µm filter mbv een steriele spuit in 14ml steriel falconbuis

2. **Preparatie van 3 cultuurschalen**

- Voor oöcyten:
 - gebruik 1 kleine petrischaal (35x10mm) voor 3 gesuperovuleerde vrouwen
 - noteer de stam naam op de petrischaal
 - pipetteer met een steriele pipetpunt ongeveer 2 tot 3 ml HTF medium in petrischaal
 - plaats de petrischaal in de incubator (geen olie gebruiken!)
 - incubeer overnacht op 37°C, 5% CO₂

- Voor IVF:
 - gebruik 1 grotere petrischaal (60x10mm) voor 3 gesuperovuleerde vrouwen
 - noteer de stam naam op de petrischaal
 - pipetteer in petrischaal 5 druppels HTF medium (*zie figuur 10*) als volgt:
 - 1x 500µl HTF medium perifeer van de petrischaal
 - 4x 150µl HTF medium rond 500µl HTF medium
 - pipetteer voorzichtig de paraffine olie in de petrischaal zodat alle media druppels volledig door de olie bedekt worden
 - plaats de petrischaal in de incubator
 - incubeer overnacht op 37°C, 5% CO₂



Figuur 10: IVF cultuurschaal

- Voor sperma:
 - gebruik 1 grotere petrischaal (60x10mm) per stam
 - noteer de stam naam op de petrischaal
 - pipetteer met een steriele pipetpunt 500µl HTF medium in het midden van petrischaal
 - pipetteer voorzichtig de paraffine olie in de petrischaal zodat alle media druppels volledig door de olie bedekt worden
 - plaats de petrischaal in de incubator
 - incubeer overnacht op 37°C, 5% CO₂

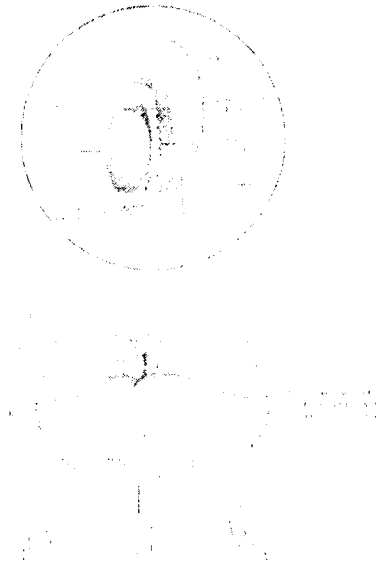
Dag 0:

1. Collecteren van vers sperma (1u voor het collecteren van de oöcyten)

- gebruik mannelijke muizen van 8 weken oud, geen paring 3 dagen voor sperma collectie
- plaats de muis op de ruif van de kooi
- offer de muis op dmv cervicale dislocatie

- leg de muis op zijn rug op een absorberend papier
- bevochtig de muis met 70% alcohol (EtOH)
- neem met een steriele grote pincet de huid van de muis vast in de onderste regio van de buik, til deze omhoog en knip met een steriel chirurgische schaar de huid van de muis volledig open zodat de inwendige organen zichtbaar zijn of scalpeer de muis door de huid in tegenovergestelde richting (richting kop en staart) te trekken onder de incisie totdat de buikholte volledig blootgesteld is. Gebruik een tweede steriele schaar om het peritoneum open te knippen zodat de inwendige organen zichtbaar zijn.
- duw de ingewanden voorzichtig aan de kant
- neem met een steriel pincet het testiculair vet vast zodat de testis, cauda epididymus en vas deferens zichtbaar worden
- knip in het spierweefsel dat de cauda epididymus vasthecht
- neem de vas deferens vast met een steriel pincet en verwijder al het rondomliggende vetweefsel en bloedvaten
- knip eerst in de vas deferens, knip daarna juist onder de cauda epididymus
- leg cauda epididymis op een steriele papierendoekje op een warmteplaat onder de microscoop
- herhaal de procedure voor de andere cauda epididymis en vas deferens
- verwijder zoveel mogelijk vetweefsel en bloedvaten van de cauda epididymis met een steriel watchmaker #5 pincet en schaar
- knip de vas deferens af
- plaats alleen de cauda epididymis naast het IVF medium in de olie van de spermapetrischaal
- maak voorzichtig het weefsel van cauda epididymis stuk met een schaar en watchmaker #5 pincet
- breng het spermaslierten van de oliefase over naar het IVF medium in de spermapetrischaal
- draai voorzichtig met de petrischaal zodat het sperma homogeen verdeeld wordt in de druppel IVF medium
- plaats de petrischaal in de incubator gedurende 1 uur op 37°C, 5% CO₂
- gebruik een wijde pipetpunt en pipetter 10µl sperma over in de **fertilisatiedruppel** op de petrischaal op een warmteplaatje

- plaats de petrischaal in de incubator op 37°C, 5% CO₂ totdat de oöcyten geïncubeerd worden

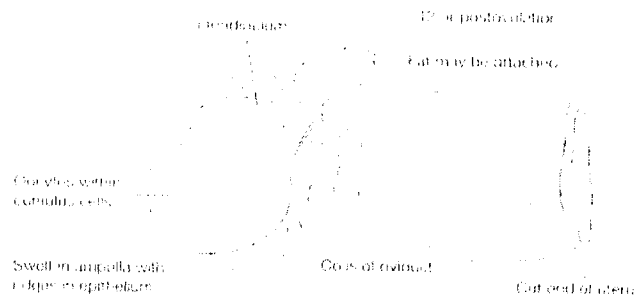


Figuur: mannelijke muis

2. Collecteren van cumulus-oöcyten complexen (1u na sperma collectie)

- gebruik gesuperovuleerde vrouwelijke muizen van 3-5 weken oud
- plaats de muis op de ruif van de kooi en offer de muis op dmv cervicale dislocatie
- leg de muis op zijn rug op een absorberend papier en bespuit de muis met 70% alcohol (EtOH)
- til met een steriele pincet de huid van de buikholte van de muis ophoog en knip met een steriel chirurgische schaar de huid van de muis volledig open zodat de inwendige organen zichtbaar zijn of scalpeer de muis door de huid in tegenovergestelde richting (richting kop en staart) te trekken totdat de buikholte volledig blootgesteld is. Gebruik een tweede steriele schaar om het peritoneum open te knippen zodat de inwendige organen zichtbaar zijn.
- duw de ingewanden voorzichtig aan de kant
- lokaliseer uterushoorn met daaraan de oviducten
- neem de uterus vast met een steriel pincet en verwijder al het rondomliggend vetweefsel en bloedvaten

- verwijder het oviduct door aan beide zijde te knippen (tussen het oviduct en ovarium en tussen het oviduct en in de uterus)
- leg het oviduct in oocytpetrischaal met IVF medium
- herhaal de procedure voor het andere oviduct
- maak met een steriele watchmaker #5 pincet onder microscoop de gezwollen ampulla van het oviduct voorzichtig stuk door voorzichtig te trekken.
- de cumuluscomplexen met de oöcyten komt vrij in IVF medium
- verwijder het oviduct uit de petrischaal
- herhaal de procedure todat alle complexen verwijderd zijn uit de ampulla
- deze procedure mag niet langer dan 5 minuten duren



Figuur: oviduct met gezwollen ampulla met oocyt complex

3. Bevruchting in de petrischaal

- maak eerst de steriel pipetpunt vochtig met IVF medium, dit voorkomt het plakken van de complexen aan de pipetpunt
- pipetteer (max 40µl) met een steriel wijde pipetpunt alle cumuluscomplexen van het IVF medium in de **fertilisatiedruppel** met het sperma
- plaats de petrischaal in de incubator
- incubeer de petrischaal gedurende 5 tot 7 uur op 37°C, 5% CO₂

4. Wassen van bevruchte oöcyten

- neem de petrischalen uit incubator na 5-7u incubatie op 37°C, 5% CO₂
- plaats met een steriele transferpipet alle oöcyten in de eerste wasdruppel
- breng met een nieuwe steriele transferpipet alleen de goed ontwikkelde oöcyten (geen dode of gefragmenteerde oöcyten) over in de tweede wasdruppel
- neem zo weinig mogelijk (cumuluscellen, weefsel) mee



Centrale Proefdier Voorziening
Universiteit Maastricht

Protocol: IVF

- verdeel in gelijke hoeveelheden de oöcyten over de 2 cultuurdruppels
- plaats de petrischaal in de incubator
- incubeer de petrischaal overnacht op 37°C, 5% CO₂

Dag 3:

Cryopreservatie van 2cellige embryo's

- sorteer de volgende ochtend de embryo's onder niet bevruchte, degenereerde en 2cellige embryo's
- breng alleen de 2cellige embryo's over in een druppel M2 op een petrischaal
- Cryopreservatie: zie *protocol Cryopreservatie via slow-freezing*

Verwerking van de resultaten

De resultaten worden genoteerd op het protocolblad "IVF".

Protocol: Revitalisatie van muizenembryo's via oviduct transfer

Doel

Gecryopreserveerde embryo's worden ontdooid en na een aantal wasstappen geïmplantéerd in een fostermuis die schijnzwanger is na paring met een steriele mannelijke muis. Ter implantatie wordt de fostermuis onder narcose gebracht, waarna het oviduct door een kleine incisie buiten het lichaam wordt gebracht. Na plaatsen van de 2cellige tot 16cellige embryo's in infundibulum wordt het oviduct terug in de foster gebracht en worden de buikwand en de huid gehecht waarna de muis herstelt. Na 19-20 dagen worden de nakomelingen geboren.

Materialen

Dieren:

Pseudodrachtige muis (0,5 -2,5 dpc)
Muizenembryo's (0,5-3,5 dpc)

Uitrusting:

embryopipet
steriele falconbuis 14ml
haarnetje
hechtdraad size4/0
injectienaald 27Gx3/4"
kleenex doekjes
koudlichtbron Schott
mondslang
mondmasker 1laags
operatiehandschoenen
steriele operatie instrumenten:
- grote pincet
- watchmaker #5 pincet
- kleine pincet met stompe punt
- grove schaar
- fijne schaar met spitse punten
- naaldvoerder
- serredine klip
steriele kleine petrischaal (35x10mm)
steriele grote petrischaal (60x10mm)
pipetman 200 µl
pipetpunten 200µl
stereomicroscop
weegschaal
warmteplaat

wattenstaafjes
CO₂ incubator

Reagentia:

Antisedan® (Atipamezole 5mg/ml)
M2 media
M16 media
Nimatek® (Ketamine 100mg/ml)
Rimadyl® (Carprofen 50mg/ml)
Spuutfles met 70% ethanol
Steriel NaCl 0,9%
Sedator® (Medetomidine 1mg/ml)
Terramycin oogzalf

Uitvoering

1. Vorbereidingen:

- Zet het warmtematje aan op 37°C
- maak volgende oplossingen klaar als volgt:
 - het narcoticum Ketamine met Medetomidine (toediening: 75mg/kg + 1mg/kg sc of ip): voeg 0.75ml Ketamine (100mg/ml) en 1 ml Medetomidine (1mg/ml) toe aan 8.25ml steriel NaCl 0,9 % oplossing. Dien 100µl narcoticum per lichaamsgewicht toe via een subcutane injectie. Het restant kan nog 24 uur worden gebruikt mits bewaard bij 4 °C.
 - de pijnstilling Carprofen: meng 1ml Carprofen (50mg/ml) met 9ml steriel NaCl 0,9 % oplossing. Dien 10µl carprofen per lichaamsgewicht toe via een subcutane injectie. Het restant kan nog 24 uur worden gebruikt mits bewaard bij 4 °C.
 - de antisedan: meng 0,2ml Atipamezole (5mg/ml) met 9,8ml steriel NaCl 0,9 % oplossing. Dien 100µl antisedan per lichaamsgewicht toe via een subcutane injectie. Het restant kan nog 24 uur worden gebruikt mits bewaard bij 4 °C.
- Leg vervolgens het operatiemateriaal klaar (grote pincet, kleine pincet met stompe punt, watchmaker pincet 3x, kleine schaar, naaldvoerder met hechtdraad en een wattenstaafje), de oogzalf,
- Ontdooi de embryo's volgens het ontdooiprotocol

2. Preparatie van de fostermuis:

- Kies een muis welke geplugd is door een steriele dekman en waarbij de plug is geconstateerd in de ochtend van de implantatiedag (ED 0,5).
- Weeg de fostermuis.

- Fixeer de muis en dien per gram lichaamsgewicht 100 µl narcoticum subcutaan toe aan de muis. Als de verdoving intreedt, wordt de pijnstilling toegediend via een subcutane injectie.
- Hierna wordt de linkerflank geschoren met de mini-tondeuse tussen schouderblad en dijbeen. Rechtshandige personen gebruiken bij voorkeur de linkerflank zodat het linker oviduct gebruikt wordt voor de terugplaatsing van de embryo's.
- Leg de foster op het warmtematje op een tissue op zijn buik. Via de tissue is de muis makkelijk te verplaatsen zonder dat deze daadwerkelijk aangeraakt hoeft te worden.
- Breng oogzalf aan op beide ogen om uitdroging te voorkomen.
- Controleer of de narcose volledig is door met een pincet in een teen te knijpen. De voetreflex, die zich uit in een trekkende beweging met het been, moet achterwege blijven.
- Besproei een kompres met 70% ethanol en neem de geschoren plek hiermee af zodat alle losse haartjes worden verwijderd. Rechtstreeks besproeien van de muis leidt tot onderkoeling en moet worden vermeden.
- Bepaal de plaats van incisie. Deze ligt 1 cm van de rugzijde verwijderd en midden tussen de onderzijde van de borstkas en de bocht van het achterbeen.
- Pak de huid vast met het pincet en til deze op.
- Knip vervolgens een verticale opening door de huid van circa 0,5 cm. Hierbij wordt de schaar in verticale positie gehouden zodat een mooi rechte snede ontstaat.
- Pak nu het bindweefsel vast op dezelfde positie en knip dit op dezelfde manier door.
- Vervolgens wordt de spierlaag opgetild en wordt deze eveneens doorgeknipt. Het is van belang de spierlaag hoog op te tillen zodat onderliggende organen niet worden beschadigd.
- Het vet geassocieerd met het ovarium/oviduct is nu zichtbaar als een witte massa. Pak het vet vast met de kleine pincet met stompe punt en trek het voorzichtig naar buiten tezamen met het ovarium, oviduct en een stukje uterus.
- Fixeer het oviduct door het vet vast te klemmen met een sefferine klip.

3. Implantatie van de embryo's:

- Maak nu de implantatiepipet als volgt klaar: zuig achtereenvolgens op: M2 medium, een kleine luchtbel, 20-25 embryo's zij-aan-zij en een tweede kleine luchtbel. Het

aantal embryo's mag niet kleiner zijn dan 12 omdat dit de kans op zwangerschap sterk verkleind.

- Na vullen wordt het pipet in de houder op de tafel weggelegd.
- Breng de muis onder de stereomicroscoop en zoek het infundibulum op. Dit gaat gemakkelijker door het geassocieerde vet nabij het oviduct beet te pakken met een watchmaker pincet en vervolgens omhoog te trekken. Merk op dat het infundibulum is gelokaliseerd onder het transparante bursa membraan.
- Maak nu met behulp van twee watchmaker pincetten voorzichtig een klein scheurtje in het membraan op het punt tussen ovarium en oviduct en bij het infundibulum. Let er hierbij op de bloedvaten in het membraan niet stuk te maken.
- Breng nu het uiteinde van de implantatiepipet zo ver mogelijk in het infundibulum, dat is tot vlak voor de natuurlijke bocht, en blaas het pipet uit tot en met de laatste luchtbel. Ga voorzichtig te werk zodat het infundibulum niet beschadigd wordt.
- Bij een succesvolle implantatie zijn de beide luchtbelllen zichtbaar in het infundibulum en zullen ze verhinderen dat de ingebrachte embryo's uit het oviduct vloeien.
- Vervolgens wordt de spierlaag met een watchmaker pincet vast gepakt aan de bovenkant van de snede en wordt deze omhoog getrokken zodat een holte ontstaat.
- Het ovarium/oviduct wordt nu teruggebracht in het lichaam door het geassocieerde vet beet te pakken met een kleine pincet met stompe punt en dit vervolgens voorzichtig in de holte te leiden.

4. Afronding en nazorg:

- Na terugplaatsing van het ovarium/oviduct in het lichaam wordt de snede in de spierlaag met één hechting gesloten.
- De huddelen kunnen netjes bij elkaar worden gebracht door er met een wattenstaafje overheen te strijken en er tegelijkertijd een rollende beweging mee te maken in tegenovergestelde richting.
- De huid wordt gesloten met twee hechtingen waarbij er op wordt gelet dat hechtingen in huid en spierlaag niet precies op elkaar komen te liggen en tevens dat de huid niet wordt vastgehecht aan de spierlaag.
- Tenslotte wordt de foster subcutaan geïnjecteerd met het Antisedan.

- Als de muis bijgekomen is van de narcose wordt de muis terug in zijn kooi op een tissue gelegd. Leg wat voer in een hoekje van de kooi.
- Nadat de fostermuis is hersteld van de narcose kan ze worden verplaatst naar het dierenverblijf.
- De dag na de implantatie wordt de muis gecontroleerd op herstel en worden de hechtingen geïnspecteerd.
- Nakomelingen worden circa 18-19 dagen na implantatie verwacht.

Verwerking van de resultaten

De resultaten worden genoteerd op het protocolblad "Revitalisatie".

Na 5 tot 8 dagen na de geboorte van de pups kan de genotypering uitgevoerd worden.

Kwaliteitscontrole

Na het spenen van de pups wordt de microbiologische status gecontroleerd. Dit gebeurt door het opsturen van de fostermuis

Aan: 1

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
28-02-2011

Project: Cryopreservatie en revitalisatie van muizenstammen.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-026

Diersoort: muis

Aantal dieren: 2500

Einddatum: 25-02-2015

Postadres

Postbus 616

6200 MD Maastricht

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

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM

U