

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-021

Herziene versie

Ontvangen: 30-06-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
06-07-2011	Nieuw

VROM/GGONR³
02-141

LNV/CBDNR⁴

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 3098 3113 N

Titel van het onderzoek:

De rol van Junctional Adhesion Molecule (JAM)-A op adhesie en trans migratie van monocyten en leukocyten onder normale condities en in atherosclerose

startdatum 01-04-2011

einddatum⁹ 01-04-2015Duur van de proef¹⁰: 1 week

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

Diergroep	1	2	3	4	5
ctrl/exp/sham	Donor				
Diersoort	01	01	01	01	01
Stam	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6
Construct / mutatie ?	-	-	ApoE ^{-/-}	eJAM-A ^{-/-} (B6-tg(VECad-Cre) (JAM1-P))	eJAM-A ^{-/-} /ApoE ^{-/-}
Herkomst (leverancier) *	01	01	02	02	02
Aantal	5	14	28	28	28
Geslacht	M/V	V	V	V	V
Dieren immuuncompetent ?	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	12 wks	6-12 wks	6-12 wks	6-12 wks	6-12 wks
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 *	04	04	04	04	04
Mate ongerief *	04	04	04	04	04
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: De rol van Junctional Adhesion Molecule (JAM)-A op adhesie en transmigration van monocyt en leukocyten onder normale condities en in atherosclerose

1. Doel van de proef

Gedurende eerdere experimenten (experiment 2008-140 en 2008-152) hebben we gebruik gemaakt van ex vivo en in vivo Microscopy om de rol van microvaten in atherosclerotische plaques verder te ontrafelen. Tijdens deze studies is reeds gebleken dat deze vaatjes een verhoogde adhesie en extravasatie van immuuncellen laten zien. Uit de literatuur, als ook uit onderzoek van een onderzoeksgroep in Aken waarmee op dit gebied wordt samengewerkt, is bekend dat een belangrijke factor voor adhesie en permeabiliteit van bloedvaten het molecuul JAM-A (ofwel JAM-1) is [1]. Zo is onder andere reeds gekend dat deficiëntie van JAM-A zorgt voor een reductie in immuuncel-infiltratie in de lever [2] en de a. carotis [3], als ook in modellen voor peritonitis en hartschade [4]. De exacte mechanismen hierin zijn echter nog onbekend. Het doel van dit onderzoek is om initieel de rol van JAM-A op met name transmigration van monocyt en leukocyten in de vaatwand te bestuderen. Hierbij zal primair worden gekeken naar de transmigration vanuit het lumaal endotheel. Daarnaast zal in een eJAM-A^{-/-} ApoE^{-/-} model ook de transmigration vanuit adventitiële microvaten worden bepaald.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Atherosclerose is de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse samenleving. Het is een progressieve inflammatoire ziekte van de grote slagaders waarbij lipiden, cellen, en extracellulaire matrix in de vaatwand ophopen en uiteindelijk leidt tot de vorming van een atherosclerotische plaque. De progressie van een plaque kan stenose van het vat veroorzaken, echter klinische complicaties zoals hart- en herseninfarcten ontstaan meestal door het openscheuren van een plaque (plaque ruptuur) en de hierop volgende vorming van een bloedstolsel (thrombose). De influx van nieuwe immuuncellen, als ook de vorming van nieuwe vaatjes nabij de plaque, draagt in sterke mate bij aan de progressie van de ziekte [5].

Door gebruik te maken van is het mogelijk om *in vivo* de interacties van endotheel en immuuncellen te bestuderen. Hierdoor kan het exacte mechanisme van JAM-A gemedieerde immuuncel-extravasatie ontrafeld worden, wat in de toekomst kan leiden tot nieuwe targets voor interventies.

3. Alternatieven

Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met . Alternatieven, zoals celweek experimenten, kunnen noch het proces van atherosclerose, noch de nieuwe vaatvorming in atherosclerotische plaques, voldoende nabootsen. Het betreft een gecompliceerd proces is, waarbij interacties tussen verschillende celtypes, shear stress en productie van verschillende cytokines en groeifactoren een belangrijke rol spelen. Binnen) is inmiddels *in vitro* onderzoek gedaan om de rol van JAM-A te ontrafelen. Om nu echter de rol *in vivo* te kunnen bestuderen, is het onvermijdelijk om dit, in de setting van lokale processen ter hoogte van de atherosclerotische plaque, m.b.v. proefdieren uit te voeren. Er is dus geen alternatief voorhanden, waarbij geen gebruik wordt gemaakt van proefdieren.

4. Ethische afweging

De cardiovasculaire complicaties van atherosclerose is de belangrijkste doodsoorzaak in de Westerse wereld. In Nederland overleden in 2003 bijna 50.000 personen ten gevolge van hart- en vaatziekten. Dit experiment kan geplaatst worden in het bredere kader van fundamenteel onderzoek naar de rol van nieuwe vaatvorming in de progressie van atherosclerose. In dat kader vinden wij dat het belang van het onderzoek opweegt tegen het ongerief van de proefdieren.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Atherosclerose is een progressieve inflammatoire ziekte van de grote slagaders waarbij lipiden, ontstekingscellen, en extracellulaire matrix in de vaatwand ophopen en uiteindelijk leidt tot de vorming van een atherosclerotische plaque. Atherosclerose verloopt progressief in de tijd, zowel in de humane situatie, als in diersystemen [6,7]. In gevorderde stadia van atherosclerose, worden de plaques instabiel, wat kan leiden tot ruptuur van de plaque. Deze ruptuur is de oorzaak van de klinische complicaties zoals hart- en herseninfarcten door vorming van een bloedstolsel (thrombusvorming).

Angiogenese, de vorming van nieuwe bloedvaten uit bestaande bloedvaten, is onder normale omstandigheden essentieel voor embryogenese, maar ook voor normale humane fysiologie (bijvoorbeeld wondgenezing). In veel pathologische processen, waaronder als bekendste voorbeeld de tumorigenese, speelt angiogenese een belangrijke rol. Sinds de jaren '80 is uit onderzoek gebleken dat angiogenese echter ook een rol speelt in atherosclerose [8]. Deze groeiende aandacht voor de rol van angiogenese in atherosclerose, richt zich voornamelijk op de rol in progressie van plaquevorming en vergroting van plaque-instabiliteit. In de zich vormende plaque, worden namelijk nieuwe vaten gevormd, mogelijk als gevolg van lokaal zuurstofgebrek (door belemmering van zuurstoftransport door de plaque en door het hoge zuurstofgebruik van in de plaque aanwezige ontstekingscellen) [6].

Onderzoek bij de vakgroep _____ (UM) heeft aangetoond dat _____ gebruikt kan worden om de (atherosclerotische) vaatwand te bestuderen. Recentelijk heeft de verantwoordelijk onderzoeker m.b.v. deze techniek in combinatie met o.a. immunohistochemische tools, kunnen aantonen dat in c

Zoals al eerder beschreven, is uit de literatuur en eerdere data bekend dat een belangrijke factor voor adhesie en permeabiliteit van bloedvaten het molecuul JAM-A is [1]. Deficiëntie van JAM-A zorgt voor een reductie in immuuncel-infiltratie in de lever [2] en de a. carotis [3], als ook in modellen voor peritonitis en hartschade [4]. Preliminair data tonen aan dat, in atherogene condities, er verschillen zijn in expressie van JAM-A, als ook in dynamiek and expressiepatroon van JAM-A. Gezien de eerder aangetoonde verhoogde adhesie en extravasatie van immuuncellen (studie 2008-152) aan en uit microvaten bij de plaque, en de daarbij behorende afwijkende expressie van JAM-A, is het voor de hand liggend om de rol die JAM-A speelt nader te onderzoeken.

Dieren die deficiënt zijn in endotheliaal JAM-A (B6-tg(VECad-Cre) (JAM1-P)) en de eJAM-A^{-/-}ApoE^{-/-}, zullen gebruikt worden om de rol van JAM-A verder te ontrafelen. Er zal gebruik gemaakt worden van eJAM-A^{-/-} als ook eJAM-A^{-/-}ApoE^{-/-} dieren, in vergelijking met ApoE^{-/-} en C57Bl/6. Door al deze modellen te combineren, kan er, naast het bestuderen van de plaque-geassocieerde microvaten ook gekeken worden naar het lumenale endotheel, waardoor er een compleet beeld van immuuncel-influx naar de plaque kan worden verkregen. Primair zal er gekeken worden naar atherosclerotische plaques in de carotiden, daar deze vaten goed *in vivo* geïmaged kunnen worden met behulp van _____. Verder zal er gebruik worden gemaakt van een periarteriële gel met/zonder toegevoegde TNF α , ter stimulering van adhesie en extravasatie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Deze studie wordt uitgevoerd in het kader van het _____ project, een project dat een samenwerking is van de afdelingen _____ en _____

Daarnaast wordt dit project uitgevoerd in samenwerking met het _____

Het project is door _____ goedgekeurd. De PI heeft dit project gelezen en akkoord bevonden.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Muis; C57Bl/6, ApoE^{-/-}, eJAM-A^{-/-} (B6-tg(VECad-Cre) (JAM1-P)) en eJAM-A^{-/-}ApoE^{-/-}

C57Bl/6: Dieren van deze groep zullen voor ingezet worden voor training (groep 1), als ook voor een referentiegroep (groep 2). C57Bl/6 dieren zijn afkomstig uit eigen fok.

ApoE^{-/-}: ApoE^{-/-} dieren zijn afkomstig uit eigen fok en zullen worden ingezet in groep 3. Deze groep dient ervoor om de basale effecten van het ApoE^{-/-} genotype op JAM-A te bestuderen en dient feitelijk als referentie voor de dubbel knockout dieren in groep 5.

eJAM-A^{-/-} (B6-tg(VECad-Cre) (JAM1-P)) [9,10]: Dieren zijn momenteel gehuisvest in het) en zullen voor experimenten moeten worden overgebracht naar Maastricht. Dieren zullen hier ingezet worden voor groep 4. Daar het een conditionele knock-out betreft, dient tamoxifen te worden gegeven om de knock-out te induceren. Binnen deze groep zullen dus subgroepen ingezet worden die wel/geen tamoxifen hebben ontvangen (zie punt 7c).

eJAM-A^{-/-}ApoE^{-/-}: Dieren zijn momenteel gehuisvest in het en zullen voor experimenten moeten worden overgebracht naar Maastricht. Deze dieren zijn een kruising van de eJAM-A^{-/-} en de ApoE^{-/-} dieren. Dieren zullen hier ingezet worden voor groep 5.

7b. Sexe

Voor de ontwikkeling van atherosclerose, zijn er slechts kleine verschillen bekend tussen mannetjes en vrouwtjes ApoE^{-/-}, zeker op hogere leeftijd. Gezien het feit dat de variatie onder vrouwtjes ApoE^{-/-} muizen lager is dan bij mannetjes, is hier voor vrouwtjes gekozen. Verder wordt het gebruik van 1 sexe in dit deel van het experiment geprefereerd om de experimentele variatie laag te houden. Gedurende eerdere experimenten zijn ook vrouwtjes gebruikt, vandaar dat voor dit experiment ook vrouwtjes worden geprefereerd. Voor groep 1 (training) is het geslacht niet van belang.

7c. Aantallen

Voor de verschillende groepen zijn verschillende aantallen muizen nodig. Berekening van de aantallen is als volgt:

Groep 1: Voor deze groep is geen berekening uitgevoerd. Voor deze groep wordt geschat dat 5 dieren nodig zijn om de procedure voldoende te beheersen.

Groep 2 t/m 5: Deze groep dieren ten behoeve van MPLSM imaging. Er zijn 4 experimentele groepen, namelijk:

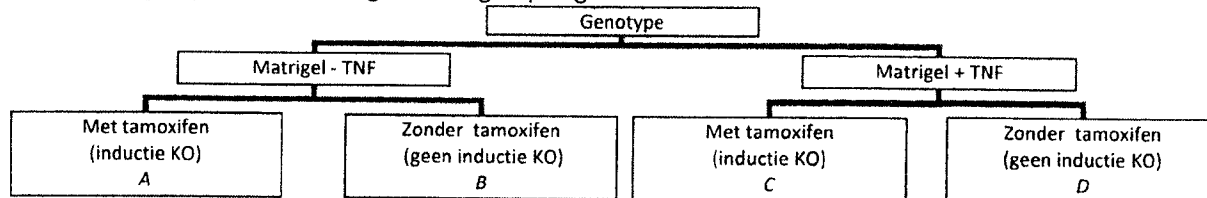
Groep 2: C57Bl/6 (alleen B en D; zie onderstaand schema)

Groep 3: ApoE^{-/-} (A t/m D; zie onderstaand schema)

Groep 4: eJAM-A^{-/-} (A t/m D; zie onderstaand schema)

Groep 5: eJAM-A^{-/-}ApoE^{-/-} (A t/m D; zie onderstaand schema)

Binnen elke groep worden de volgende subgroepen gekenmerkt:



Gebaseerd op de eerdere experimenten met andere, vergelijkbare markers (experiment 2008-152, 2010-006), zullen 5 muizen per subgroep nodig zijn om de benodigde resultaten te krijgen (uitleesparameters leukocyte-adhesie en -transmigratie per vaatoppervlakte). Uitgaande van deze eerdere experimenten verwachten we een uitval van 20% voor dit experiment. Aangezien de procedure gelijk is voor alle subgroepen, is de uitval gelijk voor alle dieren. Hiermee rekening houdend, komt het totaal aantal muizen voor deze groep uit op: $5/0.80 \approx 6,25$; afgerond 7 dieren per experimentele groep. Voor groep 2 zijn er $2 \times 7 = 14$ dieren per groep nodig. Voor groep 3 t/m en 5 zijn er $4 \times 7 = 28$ dieren per groep nodig.

Totaal aantal dieren voor deze aanvraag: 1×5 (groep 1) + 14 (groep 2) + 3×28 (groep 3 t/m 5) = 103 dieren.

Dierproef

8. Experiment

Groep 1: C57Bl/6; Dieren van deze groep zullen gebruikt worden om de experimentele procedure (operatie voor toedienen periarteriële gel) en imaging van de in dit experiment gebruikte, specifieke liganden (antiCD115-Alexa488 en antiCD31-Alexa546) te optimaliseren.

Groep 2 t/m 5: Experimentele groepen.

Groep 2:

C57Bl/6 (referentiegroep voor de groepen 3, 4 en 5)

Groep 3:

ApoE^{-/-} (referentiegroep voor groep 5)

Groep 4:

eJAM-A^{-/-} (experimentele groep met deficiëntie in endotheliaal JAM-A)

Groep 5:

eJAM-A^{-/-} ApoE^{-/-} (experimentele groep met hyperlipidemie en deficiëntie in endotheliaal JAM-A)

Deze dieren zullen, 5 dagen voor toediening van periarteriële gel, tamoxifen toegediend krijgen via het drinkwater. De procedure voor toediening van de periarteriële gel (matrigel) staat beschreven in de SOP. Vervolgens wordt 12-24 uur later het dier weer onder anesthesie gebracht om de carotis ter hoogte van de bifurcatie te imagen met behulp van . De procedure hiervoor wordt gevolgd zoals eerder ook beschreven in experimenten 2008-152, 2010-006, met uitzondering van dat bij dit experiment gedurende de operatie de matrigel plug zal worden verwijderd. Hieronder in het kort de gevolge procedure (zie ook SOP):

- Subcutane toediening van chirurgische anesthesie voor een *in vivo* multifoton onderzoek van maximaal drie uur: ketamine (100mg/kg) + xylazine (10mg/kg), ofwel ketamine (75 mg/kg) + medetomidine (1.0 mg/kg) + atropine (0.04 mg/kg). 15 minuten na de inductiebolus zal een s.c. infuus worden aangelegd (27G naald via een PE10 buis) en zal de anesthesie worden onderhouden met maximaal de helft van de 1^e injectie (inductie) per uur ($\pm 0,15$ ml/h/30 gram).
- De l ruimte is niet geschikt voor isofluraan als anesthesie, daar er geen afzuiging is. Vandaar dat gekozen is voor injectieanesthesie.
- Injectie van de dieren met de betreffende liganden ten behoeve van imaging. Injectie gebeurt via de vena femoralis (zie SOP Far-01-M), zoals ook toegepast in experiment 2008-152, of alternatief via de staartvene. In alle gevallen betreft het één injectie waarbij een of meerdere liganden gelijktijdig worden geïnjecteerd. Na injectie wordt 30 minuten gewacht tot het niet-gebonden ligand is geklaard uit het bloed alvorens de -meting begint. In deze tussenliggende periode wordt de carotis vrijgeprepareerd.
- Fixatie van het dier in rugligging, verwijderen van de matrigel plug en vrijprepareren van de carotis (cfr. experiment 2008-152, 2010-006) en *in vivo* imaging.
- Na afloop van het experiment zullen de dieren geëuthanaseerd worden middels een overdosis pentobarbital (1:10 verdund in NaCl, 150 mg/kg (± 200 μ l) i.p..

De totale tijd van de gehele procedure bedraagt ca. 3-3½ uur. Imaging zal eenzijdig worden uitgevoerd. De andere zijde zal gebruikt worden voor histologische analyse.

Vanaf 5 dagen voor de start van het experiment (op leeftijd van 6-12 weken). Tamoxifen zal worden toegevoegd aan het drinkwater bij dieren van groep 3 t/m 5, subgroepen A en C (zie schema punt 7).

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Subcutane toediening van chirurgische anesthesie: ketamine (100mg/kg) + xylazine (10mg/kg) ofwel ketamine (75 mg/kg) + medetomidine (1.0 mg/kg) + atropine (0.04 mg/kg).

De inductiebolus van de subcutane anesthesie is voldoende voor de eerste 30 minuten. De eerste bolus zal handmatig worden toegediend, waarna onderhoud van de anesthesie zal gebeuren d.m.v. een continu infuus. 15 minuten na de inductiebolus zal een s.c. infuus worden aangelegd (27G naald via een PE10 buis) en zal de anesthesie worden onderhouden met maximaal de helft van de 1^e injectie (inductie) per uur

($\pm 0,15$ ml/h/30 gram).

Voor metingen die niet verder vergeleken dienen te worden met eerdere studie, zal in plaats van xylazine gekozen worden voor medetomidine in combinatie met atropinesulfaat.

Toediening van de anesthesie staat verder beschreven in een SOP (zie verder).

De ogen zullen behandeld worden met oogzalf, om uitdroging tegen te gaan.

Toediening periarteriële gel

Inductie anesthesie 4.0% isofluraan gemengd met perslucht; onderhoud anesthesie 2.5% isofluraan. De ogen zullen behandeld worden met oogzalf, om uitdroging tegen te gaan.

Opoffering

Dieren zullen opgeofferd worden middels overdosis pentobarbital (1:10 verdund in NaCl, 150 mg/kg (ca. 200 μ l)) i.p.; vervolgens zal bloed worden afgenomen nemen.

9b. Pijnbestrijding

Daar de dieren chirurgische anesthesie krijgen is er reeds een combinatie van anesthesie en analgesie aan het dier gegeven. Bij voorgaande experimenten (2008-152) is gebleken dat de gebruikte anesthesie/analgesie voldoende is.

Toediening periarteriële gel

Pre-operatief: Indomethacin (0.5mg/kg; NSAID) en temgesic (0.05 mg/kg).

Post-operatief: Temgesic (0.1mg/kg), buprenorphine hydrochloride. Toe te dienen vanaf ontwaken uit anesthesie tot de volgende morgen.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Euthanasie middels overdosis pentobarbital (1:10 verdund in NaCl, 150 mg/kg (ca. 200 μ l)) i.p.
- Er worden geen complicaties verwacht. Echter, de dieren zullen voortijdig worden gedood bij:
 - Ziektes of condities welke ernstig ongerief indiceren
 - Snelle of gegeneraliseerde afname in gewicht (meer dan 10%) en zelfverzorging en abnormale verschijning over een lange periode
 - Bewijs voor microbiële infecties of andere ziektes die kunnen interfereren met het experimentele protocol of een van voorgenoemde punten veroorzaken
 - Ernstige complicaties gedurende het *in vivo* imagen, bijv. ernstige bloedingen
 - N.B. Gezien er geen collar wordt geplaatst, maar slechts een periarteriële gel, wordt niet verwacht dat er complicaties zullen optreden die mogelijk bij collarplaatsing ontstaan (cirkelgan, scheefhouden van het hoofd).

Zorg

10a. Ongerief

Afhankelijk van groep. Overzicht van verschillende handelingen:

Tijdstip	Handeling	Duur	Frequentie	Ongerief
-5 dagen (groep 3, 4 en 5)	Toediening tamoxifen via voeding/drinkwater	-	Gedurende 5 dagen tot experiment	01
Dag 1	Anesthesie voor toediening matrigel	5 min	1x	02
	Vrijpreparen en toedienen matrigel (met/zonder TNF) rond carotis bifurcatie	20-30 min	1x	04
12-24u na dag 1	Chirurgische anesthesie voor imaging; Canulatie v. femoralis; Injectie probes	5 min 20min 5 min	1x	02
	Operatie en imaging	2-3 uur	1x	04
	Opofferen na imaging d.m.v. overdosis pentobarbital	5 min	1x	01
TOTAAL				04

- Toestand na het einde van de proef: dood

10b. Welzijnsevaluatie

Voor bepalen van het ongerief van de toediening van de matrigel, wordt uitgegaan van het ongerief bij het plaatsen van collars, daar de procedure grotendeels overeenkomstig is. Uit meerdere experimenten (collarplaatsing) binnen onze groep gebleken dat de ongeriefinschatting juist is.

Eerdere experimenten door onze afdeling hebben aangetoond dat injectie met de liganden niet-toxisch is voor muizen, noch dat er hoge mate van ongerief optreedt. Ook voor in het algemeen geldt dat er slechts uitermate geringe weefselschade optreedt, zeker in vergelijking met bijvoorbeeld confocale microscopie. In andere proeven met op onze afdeling zijn geen welzijnsproblemen opgetreden. Uit voorafgaande blijkt dat de ongeriefinschatting voor de procedure, 03 (matig), juist is.

Vanwege het doen van 2 ingrepen binnen een (zeer) korte tijd, wordt het ongerief van de imaging procedure in dit geval hoger geschat, namelijk op een ongerief van 04. Totale (maximale) ongerief voor de combinatie van verschillende technieken is 04.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren worden gehuisvest bij het CPV-UM onder de daar geldende condities en normen (groepshuisvesting). De muizen hebben ad libitum toegang tot voer en drinken; dieren van groepen 3 t/m 5 (subgroep A en C) zullen vanaf 5 dagen voor aanvang van het experiment tamoxifen toegediend krijgen via het drinkwater. De dagelijkse verzorging wordt toevertrouwd aan het personeel van het CPV. De toediening van de periarteriële gel, de injectie met liganden en zal worden uitgevoerd bij de afdeling ¹⁾. Bij calamiteiten wordt Art. 14 en vervolgens VO of VVO gewaarschuwd.

12. Deskundigheid

De VO heeft tijdens eerdere experimenten (2008-152, 2010-006) ervaring opgedaan met het doen van de hier beschreven handelingen. Verder hebben meerdere van de overige uitvoerenden reeds jarenlange ervaring met het uitvoeren van vermelde muizenexperimenten. ¹⁾ verantwoordelijke zal betrokken worden bij planning van de experimenten voor en analyse van de resultaten.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Procedure voor operatie voor toedienen periarteriële gel

De chirurgische ingreep vindt plaats onder aseptische condities.

- de muis wordt geanestheiseerd m.b.v. Isofluraan (Inductie anesthesie 4.0% Isofluraan gemengd met perslucht; onderhoud anesthesie 2.5% Isofluraan)
- de ogen van de muis worden behandeld met oogzalf om uitdroging te voorkomen
- de muis wordt gefixeerd en op 36.5 °C gehouden via een verwarmingsplaat
- de voorzijde van de nek wordt geschoren en de huid gedesinfecteerd (betadine). Een mediale

longitudinale incisie wordt gemaakt van ca. 1 cm. Door het scheiden van de m.sternocleidomastoideus van de trachea komt de a.carotis aan de rechterzijde van de muis bloot te liggen. Ditzelfde wordt ook uitgevoerd voor de a.carotis aan de linkerzijde van de muis

- met behulp van een injectiespuit wordt een kleine hoeveelheid matrigel (met of zonder TNF als stimulerende factor) rondom de bifurcatie van de carotis toegediend
- de m.sternocleidomastoideus wordt teruggeplaatst en de huid over de wond wordt gesloten (synthetische hechtzijde 5-0)
- de muis komt bij een temperatuur gereguleerde kamer (30°C)

Pre-operatieve pijnbestrijding: 0,1 mg/kg Temgesic (buprenorphine hydrochloride)

Postoperatieve pijnbestrijding: 0,1 mg/kg Temgesic (buprenorphine hydrochloride) zodra de dieren wakker beginnen te worden en aansluitend tot en met de volgende dag.

Procedure voor operatie voor in vivo imaging

Anesthesie / Injectie met liganden

- Het dier krijgt ketamine (100mg/kg) + xylazine (10mg/kg), ofwel ketamine (75 mg/kg) + medetomidine (1.0 mg/kg) + atropine (0.04 mg/kg) s.c. ingespoten als anesthesie. 15 minuten na de inductiebolus zal een s.c. infuus worden aangelegd (27G naald via een PE10 buis) en zal de anesthesie worden onderhouden met maximaal de helft van de 1^e injectie (inductie) per uur ($\pm 0,15$ ml/h/30 gram).
- Injectie van liganden (200 μ l behulp van een 27G naald via een PE10 buis) vindt plaats via de vena femoralis (zie SOP Far-01-M). Aangezien het een terminaal experiment betreft, zal de canule niet doorgevoerd worden tot aan de nek, noch zal de muis bijkomen na afloop van de canulatie (in tegenstelling tot hetgeen vermeld in SOP Far-01-M).

Operatie en in vivo imaging

- De muis wordt in rugligging gefixeerd en op 36.5°C gehouden via een gethermostreerde verwarmingsplaat waarbij de temperatuur wordt bijgestuurd via een rectaal ingebrachte thermosensor.
- Keel regio wordt geschoren, gevolgd door incisie, waarna de carotiden van de muis voorzichtig worden vrijgeprepareerd. Na verplaatsing van het dier van de operatietafel naar het visualisatieplatform, kan imaging beginnen.
- Imaging van de carotide ter hoogte van de atherosclerotische plaque (in geval van ApoE^{-/-} muizen. Procedure duurt ca. 45 minuten. Hierna zal dezelfde procedure worden gevolgd voor de andere carotide. Totale duur van het experiment bedraagt maximaal 3 uur.

Euthanasie

- Euthanasie vindt plaats na afloop van imaging door middel van een overdosis pentobarbital (1:10 verdund in NaCl, 150 mg/kg (ca. 200 μ l)) i.p.

Relevante literatuur

1. Bradfield P.F. et al. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(10):2104-12.
2. Khandoga A et al. Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood*, 2005; 106(2):725-33.
3. Zernecke A et al. Importance of Junctional Adhesion Molecule-A for Neointimal Lesion Formation and Infiltration in Atherosclerosis-Prone Mice. *ATVB*, 2006; 26:e10-e13.
4. Corada M et al. Junctional adhesion molecule-A –deficient polymorphonuclear cells show reduced diapedesis in peritonitis and heart ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2005; 102(30):10634-9.
5. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2054-61.
6. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1006-14.
7. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res.* 1995;36(11):2320-8.
8. Grundy SM. Atherosclerosis: pathology, pathogenesis, and role of risk factors. *Dis Mon.* 1983;29(9):1-58.
9. Cera, M. R., Del Prete, A., Vecchi, A., Corada, M., Martin-Padura, I., Motoike, T., Tonetti, P., Bazzoni, G., Vermi, W., Gentili, F., Bernasconi, S., Sato, T. N., Mantovani, A., and Dejana, E. (2004) *J Clin Invest* 114(5), 729-738
10. Monvoisin, A., Alva, J.A., Hofmann, J.J., Zovein, A.C., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L. (2006) *Dev Dyn* 235(12), 3413-3422



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan

I, voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 01-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“De rol van Junctional Adhesion Molecule(JAM)-A op adhesie en transmigratie van monocysten en leukocyten onder normale condities en in atherosclerose”*, is op de DEC vergadering van 25 februari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt het GGO nummer nog in te vullen op het voorblad.
- Het aantal dieren van groep 1 op het voorblad, (stemt niet overeen) is niet in overeenstemming met wat beschreven staat bij punt 7c. De DEC verzoekt dit in (overeenstemming te brengen)/aan te passen.
- Bij punt 9a verzoekt de DEC de beschrijving van de controleanesthesie aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige.

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 **2011-021**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan
_____, voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht

Betreft: Uitslag projectaanvraag DEC 2011-021

Maastricht, 10 mei 2011

Geachte _____,

Naar aanleiding van uw correspondentie inzake de projectaanvraag 2011-021, stuur ik u deze brief. In antwoord op de op- en/of aanmerkingen die in uw correspondentie naar voren kwamen, heb ik volgende zaken aangepast in de projectaanvraag:

1. Opmerking: De DEC verzoekt het GGO nummer nog in te vullen op het voorblad
Antwoord/aanpassing: Het amendement op GGO 02-141 is goedgekeurd en het GGO is nu ingevuld op het voorblad.
2. Opmerking: Het aantal dieren van groep 1 op het voorblad, (stemt niet overeen) is niet in overeenstemming met wat beschreven staat bij punt 7c. De DEC verzoekt dit in (overeenstemming te brengen)/aan te passen.
Antwoord/aanpassing: Het aantal dieren voor groep 1 stond eenmaal foutief gemeld bij punt 7c. Bij punt 7c is het aantal dieren nu in overeenstemming gebracht.
3. Opmerking: Bij punt 9a verzoekt de DEC de beschrijving van de controleanesthesie aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige.
Antwoord/aanpassing: Het voorgestelde experiment zal deels worden gebruikt als aanvulling om reeds uitgevoerde (2008-152) en nu lopende (2010-006) experimenten, waarbij zal worden gekeken wat de invloed van zowel toediening van TNF α als ook deficiëntie in JAM-A is op de microvaten die rond de carotiden liggen. Om de resultaten hiervan te kunnen vergelijken met de eerder uitgevoerde experimenten wenst de VO de anesthesie gelijk te houden aan de eerder experimenten, daar de huidige anesthesie cardiovasculaire bijwerkingen kent, en aanpassing van de anesthesie het vergelijken van de experimenten (metingen van flow snelheid, extravasatie van albumine, etc.) niet meer mogelijk maakt. Ik realiseer mij terdege dat de gekozen anesthesie niet de voorkeursanesthesie is. Aanpassing van anesthesie zou echter betekenen dat er meer dieren nodig zouden zijn. Daar het streven naar vermindering van het aantal proefdieren mijn inziens zwaarder weegt, zou behouden van de huidige anesthesie wenselijk zijn.
Wel kan de anesthesie voor toediening van de periarteriële gel worden aangepast, daar deze niet noodzakelijkerwijs in de _____ jimte dient te gebeuren. Hier zal nu gekozen worden voor isofluraan als anestheticum (cfr. protocol collarplaatsing) en is tekstueel aangepast in de aanvraag.

Bijgevoegd doe ik u een aangepaste versie van de projectaanvraag toekomen, waarin de aanpassingen d.m.v. markering zijn aangegeven. Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben. Graag verneem ik een reactie uwerzijds.

Hoogachtend,

(VO)

From: Dec Secretariaat
Sent: woensdag 1 juni 2011 14:22
To:
Subject: FW: Project 2011-021-w
Attachments: DEC 2011-021.doc; Brief bij DEC 2011-021.doc

Dag

De DEC heeft je herziene besproken en heeft nog de volgende vraag /opmerking:

De DEC is van mening dat het anesthesie protocol verfijnd kan worden door toediening van een continue infuus.

De SOP hierover is te verkrijgen via de Proefdierdeskundige.

Graag je reactie

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616 6200 MD Maastricht
T
E-mail:

Werktijden:

From:
Sent: dinsdag 10 mei 2011 9:58
To: Dec Secretariaat
Subject: Project 2011-021-w

Beste

Bijgevoegd de brief met daarin mijn antwoorden op de vragen van de DEC en het protocol met de daarin aangebrachte wijzigingen

Graag zie ik binnenkort een reactie van de DEC tegemoet

Met vriendelijke groet

Maastricht University Medical Center
Dierproeven

Uiteenloosheid
The Netherlands
Proefdierdeskundige
Dierproeven

1-6-2011

Aan
L. (naam), voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht

Betreft: Uitslag projectaanvraag DEC 2011-021

Maastricht, 30 juni 2011

Geachte

Naar aanleiding van uw correspondentie inzake de projectaanvraag 2011-021, stuur ik u deze brief. Naar aanleiding van de voorgaande brief, werd als aandachtspunt nog gegeven dat continue anesthesie zou moeten worden toegepast. Naar aanleiding hiervan heb ik op 24 juni j.l. een kort gesprek gehad met de proefdierdeskundige. Hieruit is naar voren gekomen dat, voor experimenten zoals beschreven in de aanvraag, waarbij de muizen aan het einde van de proef zullen worden opgeofferd, gebruik zal worden gemaakt van de reeds beschreven subcutane anesthesie (ketamine en xylazine), maar dan in combinatie met een continu infuus. Conform afspraak met de proefdierdeskundige zal gedurende de experimenten bekeken worden of dit het beste d.m.v. een druppelinfuus of een infuuspomp kan worden toegediend. Het aanleggen van een i.p. infuus, zoals in het door de proefdierdeskundige verstrekte protocol zal voorlopig niet worden gedaan, i.v.m. mogelijke weefselschade die ontstaat door het aanleggen van het i.p. infuus, maar met name bij het transport van de voorbereidingsruimte naar de ruimte voor *in vivo* imaging. Zeker zonder voorafgaande training, leidt dit niet tot een directe verfijning.

Tegelijk is wel met de proefdierdeskundige afgesproken om naar aanleiding van de reeds eerder aangegeven op- en aanmerkingen op de anesthesie, een eenduidig protocol te ontwikkelen voor de *in vivo* imaging zoals wij deze uitvoeren. Hierbij zullen ook nieuwere anesthetica worden meegenomen, die gekenmerkt worden door minder bijwerkingen. Waar mogelijk (bij metingen die niet vergeleken hoeven te worden met eerdere metingen), zal deze anesthesie ook al worden toegepast.

Bijgevoegd doe ik u een aangepaste versie van de projectaanvraag toekomen, waarin de aanpassingen d.m.v. markering zijn aangegeven. Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben. Graag verneem ik een reactie uwerzijds.

Hoogachtend,

.(VO)

Aan

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
06-07-2011

Project: De rol van Junctional Adhesion Molecule(JAM)-A op adhesie en transmigratie van monocysten en leukocyten onder normale condities en in atherosclerose.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM
.....
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

Hierbij 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: 2011-021

Diersoort: muis

Aantal dieren: 103

Einddatum: 06-07-2015

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