

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

versie jan. 2005

NIEUW

DECNR: 2011-079

Ontvangen: 13 mei 2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
	Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM X	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	30983335B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Non-invasieve cardiovasculaire imaging in muizen

startdatum 01-05-2011

einddatum 9 31-12-2012

Duur van de proef¹⁰: 2 weken

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	
4. Verzoekers CPV				
5. overige uitvoerenden	is		Art.9	

Diergroep	1						
ctrl/exp/sham	ctrl						
Diersoort	01						
Stam	surplus						
Construct / mutatie ?	geen						
Herkomst (leverancier) *	01						
Aantal	10						
Geslacht	Mannelijk (voorkeur)						
Dieren immuuncompetent ?	ja						
Leeftijd/gewicht	25 gram (voorkeur)						
Doel van de proef *	33						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	01						
Anesthesie *	04						
Pijnbestrijding *	01						
Mate ongerief *	02						
Toestand dier einde exp*	01						

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Non-invasieve cardiovascular imaging in muizen

1. Doel van de proef.

Hart- en vaatziekten zijn doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd. Een van de risico factoren voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten is het hebben van suikerziekte oftewel diabetes. Deze aandoening leidt tot verhoogde bloedglucose spiegels, die in staat zijn om schade te veroorzaken aan onze bloedvaten. Langdurige blootstelling aan hoge glucose spiegels leidt vervolgens ook tot schade aan belangrijke organen zoals het hart en onze nieren. Naast diabetes zijn ook o.a. obesitas (zwaarlijvigheid), hypertensie (hoge bloeddruk) en arteriosclerose (aderverkalking) risicofactoren voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten. 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. Naast epidemiologisch onderzoek in bekende cohorten maken we ook gebruik van diermodellen, maar de translatie tussen deze twee species 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. Het doel van deze pilot is dan ook om naast het aanleren van de echotechniek, cardiovasculaire eigenschappen van de vaatwand, zoals stijfheid, maar ook doorbloeding van de microcirculatie in de muis in beeld te brengen.

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. Indien deze pilot succesvol is zal er een experiment volgen waarin vaateigenschappen in de gezonde en zieke muis non-invasief in te tijd zullen 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 op een later tijdstip ook nog 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 deze pilot (en geplande 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. In deze pilot willen we de praktische haalbaarheid van enkele vaatfunctie metingen (die vaak in de mens en rat al toegepast worden) non-invasief in de muis testen.

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 te 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).

Op een later moment (vervolg studie) zullen ook bloeddruk metingen (telmetry en/of tail cuff 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

Soort, stam: We zullen gebruik maken van surplus muizen afkomstig van CPV binnen de UM.

Eindbestemming: De muizen zullen worden ge-euthanaseerd na het experiment. En gedissecteerd t.b.v. de isolatie van bloedvaten, zoals aorta, femoralis en carotis.

7b. Sexe

Om de variatie zo laag mogelijk te houden zal er bij voorkeur gebruik worden gemaakt van mannelijke surplus muizen (indien voorhanden).

7c. Aantallen

Dit experiment is 2 delig.

Op de eerste plaats zal deze pilot worden benut op een onervaren onderzoeker het echo-en van hart- en bloedvaten van de muizen aan te leren.

Ten tweede zal deze pilot ook gebruikt worden om tenminste 2 soorten technieken te verkennen en te optimaliseren.

- Het in beeld brengen van verschillende bloedvaten (carotis, aortaboog en femoralis) t.b.v. de meting van pulse wave velocity en distensibiliteit.
- Het in beeld brengen van de kleine bloedvaten (microcirculatie) van de nier en spier, t.b.v. de bloedflow in deze organen.

Om 1 en ander reproduceerbaar in beeld te brengen (rekening houden met het feit dat de echoscopist onervaren is en de vaatmetingen relatief nieuw) wordt verwacht dat een $n=10$ zal volstaan. Deze 10 muizen worden op 3 tijdstippen gemeten.

Dierproef

8. Experiment

Op $t=0$ worden van de 10 muizen een echo van het hart en de bloedvaten gemaakt. Nadruk wordt op dat moment gelegd op het aanleren van de echco-techniek (met uitgangspunt het hart dat goed in beeld te brengen is), en verkenning van de kleinere bloedvaten (carotis, aortaboog en femoralis).

Op $t=1$ (1 week later) worden alle muizen nogmaals gemeten, en zal nadruk meer liggen op de metingen van PWV en distensibiliteit.

Op $t=2$ (2 weken later) zullen de muizen voor de laatste keer gemeten worden.

Bij dit experiment zal er na de echo van hart en bloedvaten ook een bolus microbubbles (Vevo MicroMarker, VisualSonics, volume circa 100 μ l) geïnjecteerd worden in de staartvene van de muis, en vervolgens worden gekeken naar de doorbloeding van de nieren (en spieren indien mogelijk).

Hierna worden de dieren opgeofferd.

Door de herhaalde metingen zal er een vergelijk kunnen plaatsvinden tussen echoscopist 1 (ervaren analist farmacologie) en echoscopist 2 en tussen verschillende meetpunten. En er zal ook bekeken worden wat de variatie van de verschillende metingen is binnen de 10 controle dieren en of de meting goed reproduceerbaar is.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er zal gebruik worden gemaakt van isofluraan als anesthesie middel

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 complicaties verwacht bij deze pilot, maar indien zich een ziektebeeld ontwikkelt, waarbij de muizen zichtbaar lijden, zal het experiment voortijdig worden beëindigd, waarbij terminale anesthesie, gevolgd door euthanasie, plaatsvindt (dit in overleg met de verantwoordelijke onderzoekers). Euthanasie wordt gedaan door middel van cervicale dislocatie.

Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen

1. Gedrag (scoren op reactie op prikkels, belly press, twitch, wincing en whrite)
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 2 op een 1 onderdeel of combinatie van scores groter dan 3 zal het dier worden geëuthanaseerd.

10a. Ongerief



Inductie anesthesie en echo: frequentie 3 keer, duur: circa 30 minuten, ongerief 02

Bijkomen anesthesie: frequentie 2 keer, duur: enkele minuten, ongerief 02

Injectie microbubbles onder anesthesie, frequentie 1 keer, duur: 15 minuten, ongerief 01

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

10b. Welzijnsevaluatie

Na ontwaking uit de anesthesie (bijkomen in verwarmde ruimte) zullen de muizen extra geobserveerd worden.

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 standaard CPV voeding en hebben onbeperkt toegang tot water.

12. Deskundigheid

De handelingen met de dieren worden uitgevoerd door de verantwoordelijke onderzoeker in samenwerking met deskundigen van _____

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.

Aan: !

<i>Ons kenmerk</i>	<i>Doorkiesnummer</i>	<i>Maastricht</i>
1	043-	31-05-2011

Project: *Non-invasieve cardiovascular imaging in muizen.*

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
T (043)

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-079
Diersoort: muis
Aantal dieren: 10
Einddatum: 27-05-2015

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

0