

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-045

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 07-04-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
29-04-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
GGO 01-036

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	3196.1832N
--------------	------------

Titel van het onderzoek: Echogene monocytten als natuurlijke sensoren van inflammatie.

startdatum 4/2011

einddatum⁹ 3/2015

Duur van de proef¹⁰: 14 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.12	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				Art.9	
4. PI					

Diergroep	Exp 1	Exp1	Exp1	Exp2	Exp2	Exp2	Exp2	Exp2
ctrl/exp/sham	Ctrl	Exp	Donor BMM	Ctrl	Ctrl	Exp	Exp	Donor BMM
Diersoort	muis	muis	muis	muis	muis	Muis	muis	Muis
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6
Construct / mutatie ?	LDLR-/-	LDLR-/-	Nvt	LDLR-/-	LDLR-/-	LDLR-/-	LDLR-/-	Nvt
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01	01	01	01
Aantal	24	44	8	44	11	11	11	14
Geslacht	Vrouw	Vrouw	Man/Vrouw	Vrouw	Vrouw	Vrouw	Vrouw	Man/Vrouw
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Leeftijd/gewicht	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken	8-12 weken
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	31	31	31
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	01	01	01	04	04	01
Pijnbestrijding *	04	04	01	01	01	01	01	01
Mate ongerief *	04	04	01	02	02	02	02	01
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Echogene monocyten als natuurlijke sensoren van inflammatie.

1. Doel van de proef.

In de huidige Westerse samenleving is er sprake van een aanzienlijke stijging in het voorkomen van obesitas. Dit ziektebeeld gaat gepaard met de aanwezigheid van vetaccumulatie in de lever, waardoor steeds meer mensen leverontsteking ontwikkelen (Non alcoholic steatohepatitis, NASH). Deze zogenaamde niet-alcoholische steatohepatitis leidt uiteindelijk tot leverfalen. Omdat de ontstoken, vervette lever in de kliniek vaak te laat wordt opgemerkt, is behandeling ervan zeer moeilijk. Er kunnen chirurgisch stukjes lever weggenomen worden om leverontsteking op te sporen, maar deze *invasieve* methode bekijkt slechts een fractie van de lever (0.002%) en draagt risico's met zich mee, zoals bloedingen.

In eerder onderzoek hebben we een nieuwe *niet-invasieve* methode ontwikkeld om ontsteking in slagaders op te sporen. Daartoe zijn er witte bloedcellen contrastrijk gemaakt voor ultrageluid en in de bloedsomloop gebracht. De contrastrijke witte bloedcellen zijn inderdaad zichtbaar met ultrageluid (echo) en zoeken specifiek de ontstoken slagader op. Aangezien het aantrekken van witte bloedcellen uit het bloed ook een centrale rol speelt in de ontwikkeling van leverontsteking, willen we een op de lever toespitste techniek opzetten.

Het doel van de proef is een nieuwe niet-invasieve methode te ontwikkelen en te valideren om leverontsteking in kaart te brengen.

Muizen met leverontsteking zullen geïnjecteerd worden met contrastrijke witte bloedcellen, waarbij met ultrageluid de verblijftijd van de cellen in de lever wordt bepaald. Als de cellen langzamer dan normaal uit de lever wegspoelen, geeft dat aan dat de lever ontstoken is. Om de juistheid van de metingen te controleren, zullen we het leverweefsel uitgebreid bestuderen. Daarnaast zullen we testen hoe goed veranderingen in de mate van leverontsteking te volgen zijn met de nieuwe methode.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Metabole verstoringen (waaronder NASH en diabetes), maar ook hart- en vaatziekten zijn levensbedreigende aandoeningen in onze Westerse samenleving. De incidentie stijgt in de loop der jaren. Door deze stijging is er ook een stijgende vraag naar vroege markers ter diagnose. Tot op heden is het gebruik van leverbiopten de primaire diagnostische methode voor leverontsteking. Deze invasieve methode brengt meerdere complicaties met zich mee, waaronder het risico op bloedingen en een langere hospitalisatie. Daarom is de ontwikkeling van een niet-invasieve methode om leverontsteking op te sporen en in kaart te brengen noodzakelijk.

3. Alternatieven

Dit specifieke onderzoek dient uitgevoerd te worden *in vivo*, daar het gedrag van echogene bloedcellen in de levercirculatie *in situ* wordt bestudeerd. *In vitro* en *in vivo* hebben we de hechtingseigenschappen van de geladen cellen reeds onderzocht in eerdere studies in arteriën. De complexiteit van de levercirculatie, m.n. bij leverontsteking, is onmogelijk na te bootsen *in vitro* waardoor het gebruik van proefdieren noodzakelijk is.

4. Ethische afweging

In de huidige samenleving zien we een stijging van het aantal gevallen van NASH. De prevalentie zal in de toekomst hoogstwaarschijnlijk blijven stijgen en daarom is het van groot belang om niet-invasieve en betere methoden te ontwikkelen om de klinische diagnostiek te verbeteren. Het is helaas niet mogelijk om de proeven zonder genetische proefdiermodellen (zie punt 8) te doen. Er wordt zo veel mogelijk getracht het aantal dieren zo klein mogelijk te houden (door statistische onderbouwing) en het lijden te beperken. Dit proefdieronderzoek heeft een reële kans een bijdrage te leveren aan een eerdere, betere diagnose van NASH, omdat de te ontwikkelen methode geschikt is voor directe translatie naar de mens (o.a. door gebruik van bestaande ultrageluid technologie).

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Non alcoholische steatohepatitis (NASH) wordt gekenmerkt door vetstapeling in de lever (steatose) gepaard gaande met ontsteking. Terwijl steatose alleen wordt gezien als een omkeerbare situatie, is de aanwezigheid van ontsteking een belangrijke factor in de pathogenese van de lever. Onbehandeld zal NASH verder evolueren naar lever fibrose, cirrhose en uiteindelijk leverfalen. Daarom is het noodzakelijk om benigne steatosis in de lever te onderscheiden van NASH (maligne).

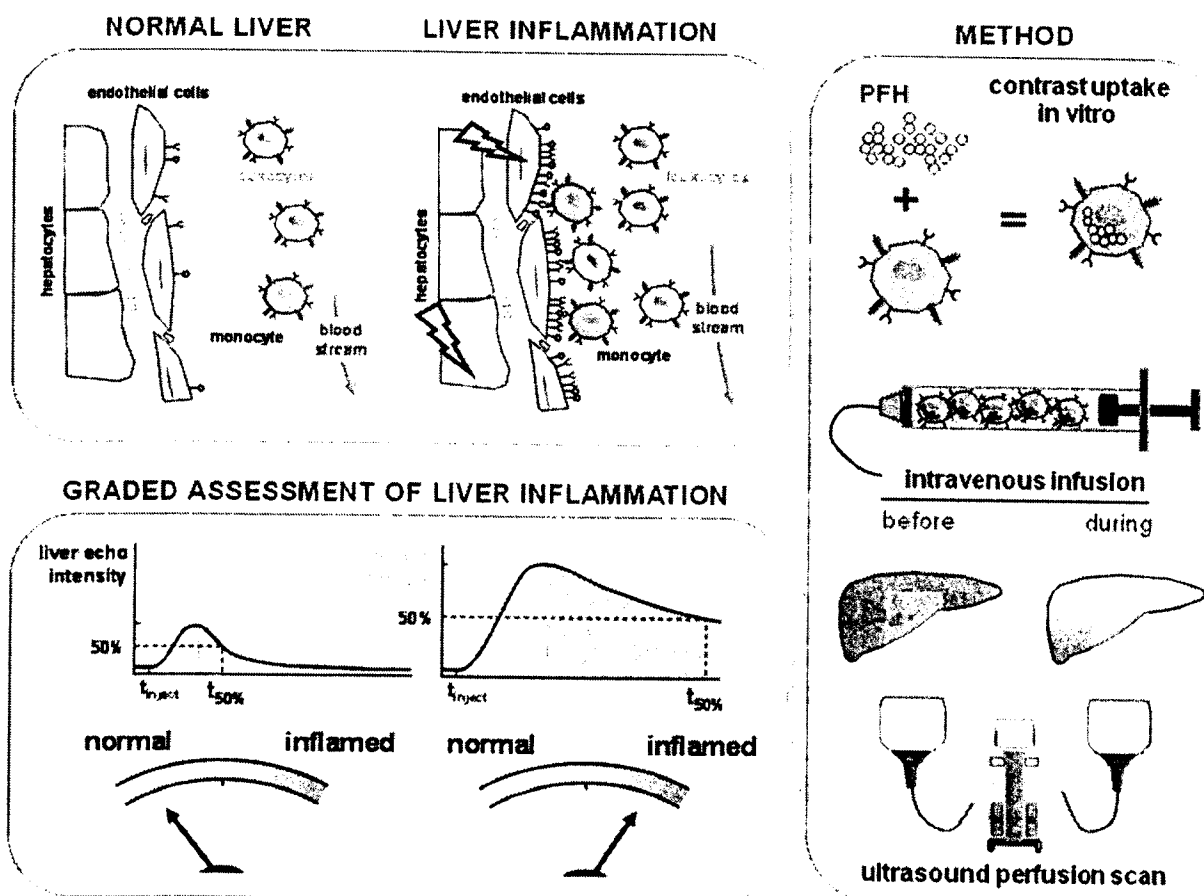
Momenteel is het nemen van leverbiopten de primaire methode voor de detectie van leverontsteking in de kliniek. Echter, hieraan zijn verschillende limitaties verbonden voor de patiënt, zoals risico's op bloedingen en een verlengde hospitalisatie. Daarnaast representeren de genomen leverbiopten slechts een minieme portie van de totale lever (0.002%) waardoor geen integraal en dus een vertekend beeld kan geven. Daarom moet er gezocht worden naar niet-invasieve methodes voor diagnostiek die ook een lever-brede schatting kunnen geven van de mate van ontsteking. In onze studie willen we een ultrageluid contrastmiddel specifiek voor ontsteking gebruiken, om daarmee het onderliggend mechanisme van monocyt-recruitment naar de lever in de aanwezigheid van NASH beschrijven. Tevens gebruiken we dit mechanisme om de aanwezigheid en graad van de ontsteking vast te stellen.

Monocyt-recruitment in de lever staat centraal in de ontwikkeling van NASH. Meerdere studies hebben reeds een verhoogde expressie aangetoond van genen belangrijk voor de hechting van monocyten aan sinusoid endotheel in levers met NASH (*Berres 2010, Kudo 2009, Yoneda 2007*). In lijn met deze resultaten induceerden we NASH in hyperlipidemische muizen en deden we een microarray studie van expressie van genen in correlatie met het lever phenotype over tijd. De verhoogde expressie van verscheidene hechtingsgenen (VCAM-1 en ICAM-1) en MCP-1 waren gecorreleerd met infiltratie van macrofagen in de lever (*Shiri-Sverdlov 2006*). Na behandeling met TO-901317, een agonist van de anti-inflammatoire transcriptie factor liver x receptor (LXR), was er een duidelijke reductie in de expressie van deze genen evenals in de infiltratie van macrofagen. Deze daling in ontsteking gebeurde ondanks in toename in steatose (*Wouters 2010*). De monocyt-recruitment in de lever wordt dus nauwelijks beïnvloedt door steatose, maar is wel direct geassocieerd met de ontstekingscomponent bij NASH (Figuur 1).

Ultrageluid wordt in de kliniek vaak gebruikt voor beeldvorming aangezien het veilig, betrouwbaar en niet-invasief is. In deze beeldvorming wordt er vaak gebruik gemaakt van een contrastmiddel om bv de perfusie van organen te beoordelen. Een alternatief voor artificiële contrastmiddelen zijn

monocyten/macrofagen welke van zichzelf al selectief kunnen hechten aan geactiveerd endotheel en de afschuifspanningen aan de vaatwand kunnen weerstaan. Het is bekend dat monocyten/macrofagen pathogenen en ander vreemd materiaal kunnen opnemen, zoals perfluorocarbon emulsies. Perfluorohexaan (PFH) is interessant omdat het geschikte akoestische eigenschappen heeft (goed echo-contrast) en geen toxische bijwerkingen heeft (excretie eenvoudig via longen). We vonden in eerdere studies dat PFH-geladen macrofagen *in vivo* detecteerbaar zijn met ultrageluid in arterieel bloed na intraveneuze injectie (bio-beschikbaarheid), en interactie vertonen (rollen en hechten) met geactiveerd endotheel in de carotis arterie in de muis (*Kornmann Mol Imag Biol 2008 en 2011 submitted*).

HYPOTHESE: Monocyten zijn dus natuurlijke sensoren van ontsteking, waardoor ze specifiek geschikt zijn om leverontsteking op te sporen. De tijdafhankelijke veranderingen in lever-echogeniciteit tijdens en na infusie van PFH-geladen monocyten zal direct gerelateerd zijn aan de mate van leverontsteking (Figuur 1).



Figuur Principe van UPMI: Ultrasound Perfluorohexane-loaded Monocyte Imaging. Tijdens leverontsteking zullen er meer monocyten hechten aan het endotheel in de lever. Door middel van injectie van perfluorohexaan-geladen macrofagen willen we met echogeluid beeldvorming de mate van leverontsteking *in vivo* in kaart brengen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC-protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI (zie voorblad).

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Alle gebruikte diermodellen zijn muizen. De stam die gebruikt zal worden is de LDLR knock-out muis (Fok UM). Als donoren zal er gebruik worden gemaakt van C57Bl6 muizen. Het gebruik is verduidelijkt onder punt 8. Na de proef worden de dieren opgeofferd en organen worden geïsoleerd.

7b. Sexe

In de uit te voeren experimenten zullen uitsluitend vrouwtjes gebruikt worden, omdat uit eerder onderzoek gebleken is dat hyperlipidemische vrouwtjes beter op een hoog-vet dieet reageren. Zij krijgen een hoger cholesterolniveau in het bloed dan de mannetjes. Bovendien blijft het niveau constanter als het dier ouder wordt. Bij mannetjes neemt het niveau af naarmate ze ouder worden (Van Vlijmen et al. JCI 1996). De muizen waarvan het beenmerg wordt genomen kunnen zowel mannetjes als vrouwtjes zijn (geen voorkeur).

7.c. Aantallen

Experiment 1

Beenmergmacrophagen bekomen van C57Bl6 donormuizen zullen geladen worden met PFH. Deze worden dan via injecties in de portale vene of staartvene tijdens ultrageluid perfusie scanning (UPMI, zie Fig. 1) ingebracht in LDLR-/- muizen die reeds op aangepast dieet hebben gestaan voor 1 week aangezien dit voldoende is om inflammatie te induceren. Daarnaast worden er 4 extra groepen voorzien (HFC en Chow) die geïnjecteerd worden met ongeladen macrophagen en een standaard contrastmiddel als controles. We verwachten dat de availability (beschikbaarheid) van de contrastmiddelen lager is bij iv (dus tail vein) injectie. Om dit in te schatten en om een optimale situatie (voor proof-of-concept) te bestuderen doen we ook portal vein injecties (maximale beschikbaarheid).

Onze inschatting is dat minimaal een effect op vlak van leverontsteking en adhesiemoleculen (bepaald dmv histologie voor infiltrerende macrofagen, neutrofielen, T-cellen; en genexpressie voor de markers TNF, MCP1, IL1b, VAP1, VCAM1 en ICAM1) zichtbaar moet zijn van meer dan 25%. Variatie is bepaald aan de hand van eerdere experimenten waarin een reeks parameters bepaald is, die laten zien dat de muizen 20% in deze parameters variëren. Met deze gegevens komt het aantal dieren per groep uit op (berekening volgens Sachs): $\sigma = 20$, $\delta = 25$ met $F = 15,7$; $n = 10.05$. De controle experimenten met niet geladen BMM en std. contrastmiddel zijn noodzakelijk om de basale effecten van cel/contrast meting in de lever vast te leggen, zodat bij UPMI de niet-specifieke effecten onderscheiden kunnen worden van de specifieke (inflammatie gerelateerd). Omdat we verwachten dat de spreiding in de metingen kleiner is, dan bij UPMI en om het # dieren te beperken, daarom 6 ipv 11 per controle groep

Experiment 1:

- LDLR-/- muizen, 1 week hoog vet dieet → staartvene injectie: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 1 week hoog vet dieet → portale vene injectie: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 1 week chow dieet → staartvene injectie: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 1 week chow dieet → portale vene injectie: **11 muizen**
- LDLR-/- muizen, 1 week hoog vet dieet → ongeladen macrophagen en standaard contrastmiddel staartvene injectie: **6 muizen**

- LDLR-/- muizen, 1 week hoog vet dieet → ongeladen macrophagen en standaard contrastmiddel portale vene injectie: **6 muizen**
- LDLR-/- muizen, 1 week chow dieet → ongeladen macrophagen en standaard contrastmiddel staartvene injectie: **6 muizen**
- LDLR-/- muizen, 1 week chow dieet → ongeladen macrophagen en standaard contrastmiddel portale vene injectie: **6 muizen**

Donoren beenmerg macrophagen experiment 1:

Per donormuis isoleren we ongeveer 20 tot 40 miljoen beenmergmacrophagen. Gemiddeld willen we per injectie 2-4 miljoen beenmergmacrophagen injecteren. Hiermee kunnen we 10 acceptormuizen injecteren met de geladen beenmergmacrophagen van 1 donormuis (68 muizen / 10 = 6.8 donormuizen nodig). Rekening houdend met de kans op complicaties tijdens de procedure willen we graag 1 donormuis extra = **8 muizen**

TOTAAL experiment 1:

Acceptoren injecties: **68 LDLR-/- muizen**

Donoren beenmergmacrophagen: **8 C57Bl6 muizen**

Experiment 2

Tijdens het tweede experiment zullen we nagaan of veranderingen in de graad van ontsteking door voeding of behandeling gevolgd kunnen worden met behulp van ultrageluid PFH-geladen monocytten beeldvorming (UPMI, zie schema experiment 2, bij punt 8).

Onze inschatting is dat minimaal een effect op vlak van leverontsteking en adhesiemoleculen (bepaald dmv histologie voor infiltrerende macrofagen, neutrofielen, T-cellen; en genexpressie voor de markers TNF, MCP1, IL1b, VAP1, VCAM1 en ICAM1) zichtbaar moet zijn van meer dan 25%. Variatie is bepaald aan de hand van eerdere experimenten waarin een reeks parameters bepaald is, die laten zien dat de muizen 20% in deze parameters variëren. Met deze gegevens komt het aantal dieren per groep uit op (berekening volgens Sachs): $\sigma = 20$, $\delta = 25$ met $F = 15,7$; $n = 10.05$.

Experiment 2:

- LDLR-/- muizen → UPMI, onbehandeld: **11 muizen**
 - LDLR-/- muizen → UPMI, behandeld met TO-901317: **11 muizen**
 - LDLR-/- muizen → Controle onbehandeld, tijdstip 1: **11 muizen**
 - LDLR-/- muizen → Controle onbehandeld, tijdstip 2: **11 muizen**
 - LDLR-/- muizen → Controle onbehandeld, tijdstip 3: **11 muizen**
 - LDLR-/- muizen → Controle onbehandeld, tijdstip 4: **11 muizen**
 - LDLR-/- muizen → Controle behandeld met TO-901317, tijdstip 3: **11 muizen**
- (tijdstippen: zie schema experiment 2 hieronder)

Donoren experiment 2:

Per donormuis isoleren we ongeveer 20 tot 40 miljoen beenmergmacrophagen. Gemiddeld willen we per injectie 2-4 miljoen beenmergmacrophagen injecteren. Op elk tijdstip hebben we 22 injecties (11 muizen behandeld en 11 muizen onbehandeld) behalve voor tijdstip 4 waarbij we slechts 11 injecties nodig hebben (enkel onbehandelde groep). Per tijdstip gebruiken we daarom 3 donormuizen en op tijdstip 4 slechts 2 (zie schema bij 8). Daardoor hebben we

beenmergmacrophagen nodig van 14 donormuizen.

TOTAAL experiment 2:

Acceptoren injecties: 77 LDLR^{-/-} muizen

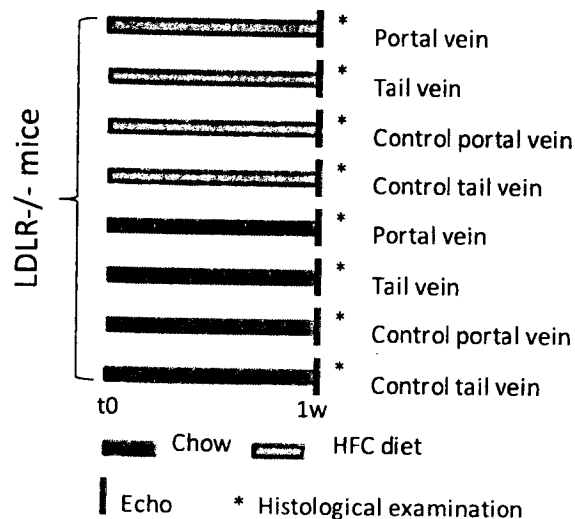
Donoren beenmergmacrophagen: 14 C57Bl6 muizen

8. Experiment

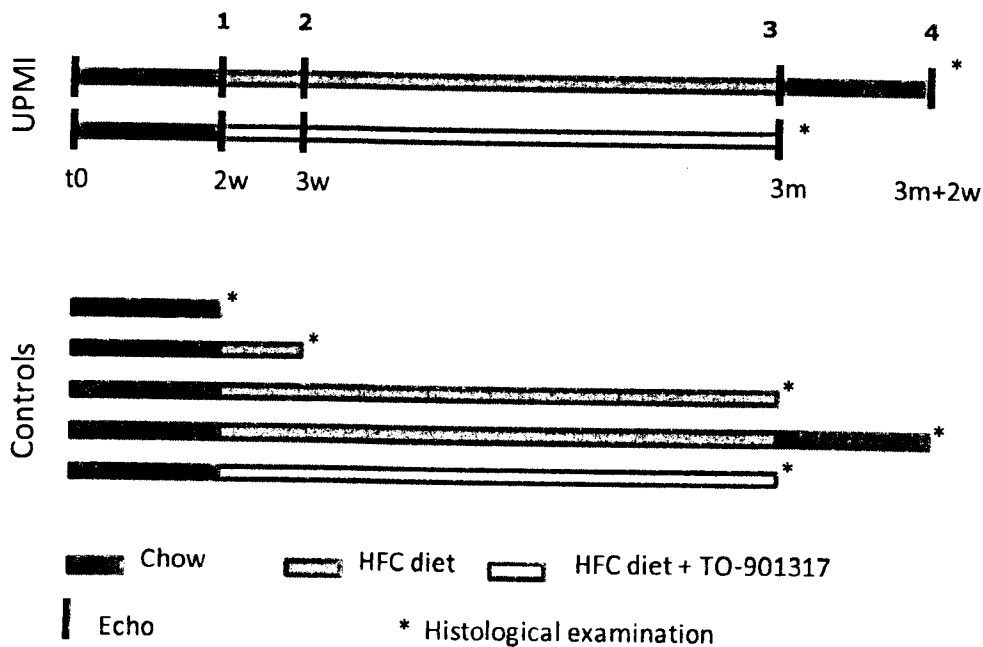
Experiment 1

Beenmergmacrophagen bekomen van C57Bl6 donormuizen zullen geladen worden met PFH. Deze worden dan via injecties in de portale vene of staartvene tijdens ultrageluid perfusie scanning ingebracht in LDLR^{-/-} muizen die op hoog vet dieet of chow dieet hebben gestaan voor 1 week. Daarnaast worden er 4 extra groepen voorzien (HFC en Chow) die geïnjecteerd worden met ongeladen macrophagen en een standaard contrastmiddel als controles.

Schema experiment 1



Schema experiment 2



Experiment 2

LDLR^{-/-} muizen zullen eerst 2 weken chow dieet, dan 10 weken hoog vet dieet en uiteindelijk weer 2 weken chow dieet krijgen. Deze (onbehandelde) groep muizen zal op 5 verschillende tijdstippen (start experiment, start HFC dieet, na 1 week HFC dieet, na 10 weken HFC dieet

en einde experiment) de UPMI beeldvorming ondergaan met beenmergmacrophagen bekomen van C57Bl6 donormuizen die geladen zijn met PFH en die geïnjecteerd worden via de staartvene. Op corresponderende tijdstippen zullen er een muizengroepen worden opgeofferd als histologische controle. Tevens zal er een muizengroep behandeld worden met TO-901317 (vanaf week 2 tot einde van HFC dieet) en ook hierbij zal er een histologische controlegroep gebruikt worden (zie schema). Op de tijdstippen van UPMI beeldvorming wordt ook bloed worden afgenomen via de staartvene na beeldvorming.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor de echografiemetingen worden de dieren onder narcose gebracht. Voor het inleiden gebruiken we isofluraan 3-4%. Daarna zal isofluraan 1.5-2.5% gebruikt worden om de narcose te onderhouden. Uitgebreide informatie terug te vinden in de SOP 'echografie bij de muis'.

9b. Pijnbestrijding

Bij de dieren die terminale puncties ondergaan zal buprenorfine worden gegeven ter analgesie.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Indien de muizen gedurende de proefperiode (dieet) te veel zouden lijden (hetgeen niet voor de hand ligt, omdat het hier om een bekend dieet gaat) worden zij in overleg met het CPV personeel opgeofferd. Uiterlijke kenmerken waaraan aandacht dient te worden gegeven zijn: uitblijven van exploratief gedrag, niet eten of drinken, geen faeces productie, afname lichaamsgewicht met 20% tov begintijdpunt. Uit eerder onderzoek is gebleken dat deze dieren geen leverfalen ontwikkelen, waardoor we ook nu geen leverfalen of oedeemvorming verwachten.

Euthanasie zal plaatsvinden door cervicale dislocatie of O₂/CO₂ overdosis bij de dieren gebruikt als histologische controles. De dieren die een echografie ondergaan zullen (bij het terminale experiment) geofferd worden door verbloeding dmv linker/rechter ventrikel of aorta punctie. Op deze manier kan er ook op het einde van de experimenten op een gecontroleerde manier voldoende bloed afgenomen worden.

Zorg

10a. Ongerief

Alle muizen worden in groepsverband gehuisvest. Het milde dieet dat wordt toegediend aan de muizen maakt de dieren niet zichtbaar ziek. Dit kan bijgevolg aanzien worden als gering ongerief (code 01). De bloedafname tijdens experiment 1 zal gebeuren voor de start van het dieet (venepunctie) en net voor de opoffering dmv terminale verbloeding. Tijdens experiment 2 zal er op de verschillende tijdstippen van echografie bloed worden afgenomen. Dit gebeurt door middel van een venepunctie en kan leiden tot een gering tot matig ongerief (code 02), aangezien de muis in een restrainer wordt gezet en dit zonder verdoving gebeurt. Het onder narcose brengen t.b.v de echografie zorgt voor matig ongerief (code 02). Dieren die via de portale vene geïnjecteerd worden hebben meer ongerief (code 04) dan de staartvene injectie.

Experiment 1	muizen met portale vene injectie	muizen met staartvene injectie
Dieet (1w)	01	01
Bloedafname dmv venepunctie (1x)	02	02
Anesthesie	04	04
Injectie	04	02
Echografie	02	02

Totaal ongerief Experiment 1: 04

Experiment 2	UPMI	UPMI met behandeling	Controles
Dieet	01	01	01
Bloedafname dmv venepunctie	02	02	02
Anesthesie	04	04	nvt
Injectie (staartvene)	02	02	nvt
Echografie	02	02	nvt

Totaal ongerief Experiment 2: 02

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere experimenten en bestaande literatuur zijn geen bijzonderheden te vermelden. Het toegediende dieet en de toegediende behandeling leiden niet tot evident zichtbare ziekteverschijnselen.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen gehuisvest worden in het CPV van de UM onder standaard condities met vrij toegang tot water en voer en een normaal dag/nacht ritme. Bij calamiteiten kan in de eerste plaats worden verwittigd, in geval van afwezigheid kan worden gecontacteerd.

12. Deskundigheid

De uit te voeren experimenten zijn vergelijkbaar met vorige studies, uitgevoerd door mensen binnen de afdeling. Binnen de groep zijn er voldoende mensen die deskundig zijn in het toedienen van injecties en afnemen van bloed. Echografie zal plaatsvinden in het echolab door/begeleid door mensen die dagelijks echografie bij kleine proefdieren uitvoeren.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Gekende samenstelling dieet:

caseïne 17% ; DL methionine 0.3% ; sucrose 34% ; zetmeel 14.5% ; cholesterol 0.2% ; cellulose 5% ; CM 205B (mineralen) 7% ; vit 200 1% ; boter 21%

Bloedafname:

- dier wordt overgebracht in restrainer
- maximaal 200 µl bloed wordt afgenomen
- dier wordt teruggebracht in kooi.

Opofferen:

De opoffering gebeurt dmv cervicale dislocatie, O₂/CO₂ overdosis of terminale verbloeding dmv linker/rechter ventrikel of aorta punctie.

Portaal vene cannulatie:

Narcose :

- Inleiden met **Isofluraan** 3 - 4 %
- Onderhouden **Isofluraan** 1.5 - 2.5 %

als de muis goed onder narcose is :

- buik open (huid en buikwand vouwen langs middenrif en op thorax leggen),
- darmen naar links op fys. zout doordrengd gaasje om portaal vene bloot te leggen,
- portaal vene wordt gecannuleerd met 30 Gauge (gele) naald, aangesloten op injectiespuit via P10 cannule,
- bloed optrekken en met fys. zout inspuiten ter verificatie plaatsing,
- fixeren naald op vene met weefselijm, en tape om P10 cannule
- terugleggen darmen en evt. lever herpositioneren
- (terugvouwen buikwand/huid tot echografie)

Echografie bij de muis

Narcose :

- Inleiden met **Isofluraan** 3 - 4 %
- Onderhouden **Isofluraan** 1.5 - 2.5 %

als de muis goed onder narcose is :

- buikzijde scheren.
- de muis wordt op zijn rug op een warmhoudplaat gelegd met een thermokoppel in het rectum verbonden met thermostatisch verwarmingselement waarmee de lichaamstemperatuur op 37°C gehouden wordt.
- de buikzijde wordt ingesmeerd met Aquasonic Ultrasound Gel en de probe van het echoapparaat wordt op de buik juist onder de borstkas van de muis geplaatst en uitgericht.
- metingen worden uitgevoerd.
- laten bij komen in een verwarmde ruimte met een temperatuur van 30°C / opoffering dier dmv terminale verbloeding middels linker/rechter ventrikel of aorta punctie

Euthanasie door verbloeding middels punctie

Aan de muizen wordt eerst buprenorfine gegeven ter analgesie. Muis wordt op de rug gelegd. De status van narcose wordt gecontroleerd en zonodig gecorrigeerd. Incisie in de abdominale huid van peri-umbilicaal tot lateraal over de ribben beiderzijds. Vervolgens wordt het peritoneum tot aan de processus xiphoideus opengelegd. Dan wordt het diafragma langs de ribbenboog afgeknipt. Tot slot wordt het ribrooster bdz. langs het manubrium ingeknipt en omgeklapt, waardoor het hart vrij komt te liggen. Hartpunctie in het rechter of linkerventrikel of aorta met 1 ml spuit met een 30G naald, gecoat met 0.5M EDTA. Centrifugeren 5 min. 13000 RPM 4°C; plasma afnemen en invriezen in vloeibaar N₂; opslag in -80°C. Organen worden uitgenomen voor verder onderzoek.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Echogene monocysten als natuurlijke sensoren van inflammatie*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt te controleren of de codes van de anesthesie juist zijn op het voorblad.
- De DEC vraagt zich af of de onderzoekers voldoende ervaring hebben met de portale vene injectie? De DEC verzoekt de SOP hiervan toe te voegen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. (De portale vene injectie dient bij het ongerief vermeldt te worden).
- De DEC veronderstelt dat de onderzoeker met de portale vene injecties begint, waarmee de maximale opbrengst te verwachten is en als de opbrengst onder verwachting is, afziet van andere injecties (staartvene).

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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 2011-045, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Geachte leden van de DEC,

Onze projectaanvraag: "*Echogene monocyten als natuurlijke sensoren van inflammatie*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt te controleren of de codes van de anesthesie juist zijn op het voorblad.
- Deze codes zijn aangepast.
- De DEC vraagt zich af of de onderzoekers voldoende ervaring hebben met de portale vene injectie? De DEC verzoekt de SOP hiervan toe te voegen.
- Er is ervaring met portaalvenecannulatie en injecties (i.s.m. - echo lab). De SOP van de portaalvenecannulatie/injectie is toegevoegd (sectie 13).
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. (De portale vene injectie dient bij het ongerief vermeldt te worden).
- Er is een tabel aangemaakt met daarin de verschillende codes voor de verschillende handelingen voor de verschillende diergroepen (sectie 10a).
- De DEC veronderstelt dat de onderzoeker met de portale vene injecties begint, waarmee de maximale opbrengst te verwachten is en als de opbrengst onder verwachting is, afziet van andere injecties (staartvene).
- Het harde eindpunt is dat er een verschil te zien is tussen de HFC en chow groep met de staartvene injecties (zie schema Exp 1, sectie 8). De portaalvene injectie experimenten zijn noodzakelijk als benchmark voor 'maximale beschikbaarheid van contrastmiddel', daar het nog niet duidelijk is hoe de gemeten responsen met portaal en staartvene zich tot elkaar verhouden. (denk aan circulatie tijd, versmering in de tijd, second pass enz.). Dus beide injectie experimenten zijn noodzakelijk.
- Daarnaast willen we er nog op wijzen dat de dieren die terminale puncties ondergaan ook pijnbestrijding ontvangen en daarvoor zijn de codes op het voorblad aangepast.

Vriendelijke groeten,

Aan: '

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
02-05-2011*Project: Echogene monocyten als natuurlijke sensoren van inflammatie.***Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

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

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies met de opmerking dat de DEC er vanuit gaat dat de experimenten via de portale vene injecties, eerst worden uitgevoerd.**

Projectnummer: 2011-045
Diersoort: muis
Aantal dieren: 167
Einddatum: 29-04-2015

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

Secretariaat DEC-UM
T (043) 1 23 45 67 89

Bezoekadres

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