

120

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM⁸

Versie 2006

Aangepast voorblad

DECNR: 2011-027

Ontvangen: 03-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²
05-04-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
02-137

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	(principal investigator)
----------------------	--------------------------

Budgetnummer	30981120B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming

startdatum 01-03-2011

einddatum⁹ 01-03-2014Duur van de proef¹⁰: 20 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					
4. overige uitvoerenden				Art.9 (in behandeling)	
5. overige uitvoerenden				Art.9 (in behandeling)	

Diergroep (protocol)	1	2	3a	3b	4
ctrl/exp/sham					
Diersoort	01	02	01	02	01
Stam	ApoE ^{-/-}	Wistar WT	ApoE ^{-/-}	Wistar	ApoE ^{-/-}
Construct / mutatie ?					
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02
Aantal	114	114	57	57	128
Geslacht	m/v	m/v	m/v	m/v	m/v
Dieren immuuncompetent ?	ja	Ja	ja	ja	ja
Leeftijd/gewicht	4 weken	7 weken	7 weken	7 weken	7 weken
Doel van de proef *	31	31	31	31	31
Belang van de proef *	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	01	04	01	01	01
Mate ongerief *	01	04	01	01	01
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01

* VHL-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM 2011-027

Titel: Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming

1. Doel van de proef.

Trombusvorming na plaqueruptuur (atherotrombose) kan een hartaanval of beroerte tot gevolg hebben. Op plaatsen in het vaatstelsel waar plaques vormen ondervindt het bloed grote veranderingen in de stroom snelheid. Bloedplaatjes spelen een belangrijke rol in trombus vorming en zijn uitermate gevoelig voor acute veranderingen in de stroom snelheid van het bloed (shear stress gradienten). Het **doel** van dit onderzoek is om te onderzoeken hoe shear stress gradienten het proces van trombus vorming beïnvloeden op plaatsen van (1) atherosclerotische plaques en (2) in aneurysme verwijdingen. In ons lab is een methode van acute plaque ruptuur ontwikkeld in ApoE^{-/-} muizen (dec-nr. 2005-138) [1] en een methode van aneurysma in ratten. We willen met behulp van intravitale microscopie het trombose proces op plaques and in aneurysmen volgen. De **hypothese** is dat de shear stress gradienten die heersen rond de plaque en in de aneurysma het trombose proces versterken. Dit project sluit aan op het eerdere project 'Regulatie van trombusvorming en embolisatie op acuut gebroken plaques in vivo' (2005-138). In deze studie is trombusvorming bestudeerd na beschadiging van atherosclerotische bloedvaten. Gebleken is dat glycoproteïne (GP) VI, tissue factor, trombine, ADP (receptoren) en integrines van belang zijn in de collageen-afhankelijke trombusvorming op geruptureerde plaques. In de huidige aanvraag worden deze factoren getest onder de invloed van shear stress gradienten.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Er bestaat een toenemende belangstelling in de kliniek voor combinatietherapie met antiplaatjes en antistollingsmedicatie. De effecten hiervan kunnen redelijk gemeten worden in geïsoleerd plaatjesrijk plasma (plaatjesfunctie, trombine generatie). Het klinisch onderzoek vraagt echter om een proefdiermodel, waarin effecten van met name dit soort gecombineerde interventies *in vivo* meetbaar zijn onder relevante pathofysiologische condities. Dit project kan in deze lacune voorzien en zal een belangrijke bijdrage leveren aan de verdere karakterisatie van de huidige *in vivo* modellen. Met name het bestuderen van het trombotische proces in een atherosclerotisch bloedvat is klinisch relevant. Hiermee kan dit 'analytisch' imaging-onderzoek een brug slaan naar het (klinisch) onderzoek, waarin deze processen op andere wijze geïdentificeerd worden.

3. Alternatieven

Vanwege de veelvuldig aangetoonde discrepanties tussen de resultaten uit *in vitro* en *in vivo* onderzoek, en met het oog op toekomstige preventieve of therapeutische interventies bij de mens, is het van belang dat bloedplaatjes-vaatwand interacties zoveel mogelijk onder fysiologische omstandigheden, *in vivo*, bestudeerd worden.

4. Ethische afweging

Volgens de onderzoeker weegt het ongerief voor het dier (= merendeel matig, terminaal experiment onder narcose en 1 groep matig/ernstig, weke delen chirurgie) op tegen het belang van de proef, omdat dit onderzoek een groot klinisch belang heeft: bestuderen van het trombotische proces in een atherosclerotisch en aneurysmatisch bloedvat. Zie verder punt 2, 3, 10.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Het is recentelijk beschreven dat bloedplaatjes kunnen aggregeren als ze bloed worden gesteld aan acute veranderingen van de bloed stroom snelheid. Meer specifiek, shear stress gradienten is de parameter waar plaatjes gevoelig voor zijn via een proces genaamd mechanotransduction. Deze nieuw beschreven vorm van plaatjes aggregatie suggereert dat de bloed stroom condities een belangrijke rol spelen tijdens het trombotische proces. De bloed stroom condities in een gezond recht vat zijn normaliter laminair maar deze condities raken verloren op plaatsen waar de vaatwand significant van vorm is veranderd. Dit is het geval bij de vorming van atherosclerotische plaques en aneurysmas. Plaques groeien langzaam over een periode van vele jaren en kunnen hierbij een aanzienlijk deel van het lumen van het bloedvat gaan innemen (plaque progressie). Plaque ruptuur leidt tot acute aanhechting en aggregatie van plaatjes tot een trombus (atherotrombose) wat het betreffende bloedvat kan afsluiten. Het gevolg is een hartinfarct of beroerte, wat belangrijke oorzaken zijn van mortaliteit en morbiditeit in de westerse wereld. Aneurysmas zijn verzwakkingen in de vaatwand die leiden tot een verwijding van het vat. De elasticiteit en sterkte van een aneurysme vat is verminderd en kan resulteren in ruptuur, met vaak ernstige acute gevolgen. Aneurysmas hebben vaak, maar niet altijd, een intraluminale thrombus in de verwijding.

Bloedplaatjes ondergaan grote shear stress gradienten als ze passeren over plaques of door aneurysmen. De link tussen plaatjes aggregatie mechanismen en shear stress gradienten is nog nooit onderzocht in grote bloedvaten. Dit is noodzakelijk omdat plaques en aneurysmas voornamelijk in grote vaten voorkomen. Het is onduidelijk welke plaatjes receptoren en onderliggende signaleringspaden een rol spelen in de trombotische respons op plaques en in aneurysmas.

Glycoproteïne Ib/V/IX en integrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ zijn belangrijke adhesie receptoren op het oppervlak van plaatjes die zijn betrokken bij de primaire en stabiele adhesie, respectievelijk. Beide receptoren zijn betrokken bij het proces van plaatjes aggregatie onder invloed van shear stress gradienten. Het is echter niet bekend of deze receptoren een zelfde rol spelen in het aggregatie proces op plaques en in aneurysmas. In tegenstelling tot GPIb en $\alpha\text{IIb}\beta 3$ zijn de autocrine plaatjes agonisten ADP en TxA2 *niet* betrokken bij plaatjes aggregatie onder shear stress gradienten.

Het **doel** van dit onderzoek is de thrombus vorming te meten als functie van de locale shear stress gradienten op atherosclerotische plaques en in aneurysmas. De **hypothese** is dat het trombotische proces wordt versterkt door lokaal heersende shear stress gradienten. Hierdoor zijn medicaties die plaatjes activatie via ADP (clopidogrel) en TxA2 (aspirine) remmen minder effectief.

In ons lab is een methode van acute plaque ruptuur ontwikkeld (dec-nr. 2005-138) [1]. In dit model wordt plaqueruptuur lokaal opgewekt in de arteria carotis ter hoogte van de bifurcatie, middels een gecontroleerde ultrageluid behandeling. Hiervoor worden ApoE-deficiënte muizen gebruikt, die na 18-20 weken cholesterolrijk dieet relatief geavanceerde atherosclerotische plaques hebben. In dit model leidt plaqueruptuur tot collageenexpositie en subocclusieve trombusvorming. Het aneurysme model in ratten is ontwikkeld in samenwerking met de universiteit van Luik volgens een gepubliceerde methode. In dit model wordt een gedeelte van de abdominale aorta tijdelijk afgekneld en een elastase oplossing intraluminaal toegediend en geïncubeerd voor 1 uur. Na 72 uur zijn verwijdingen van de aorta reeds zichtbaar en gereed voor het bestuderen van trombusvorming. De trombusvorming wordt bestudeerd met *in vivo* fluorescentie intravitaal microscopie en twee-photon laserscanning microscopie (TPLSM). Hiervoor worden de plaatjes fluorescent gelabeld. Na afloop worden de bloedvaten uitgenomen en verder geanalyseerd met TPLSM, danwel verwerkt voor histologische analyse van het trombotisch proces.

Naast de *in vivo* metingen, worden *in vitro* perfusie proeven uitgevoerd waarin we het bloed van de muizen laten stromen door microchannels met afmetingen en vormen die de plaques en aneurysmas

in vivo modelleren. In deze proeven worden de trombi gevormd in de microchannels in beeld gebracht met DIC-contrast en fluorescentie microscopie. Remmers van de adhesie receptoren GPIIb/IIIa en α IIb β 3 en signaleringswegen via ADP en TxA2 worden toegepast, om het werkingsmechanisme te ontrafelen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC-protocol is gelezen en goedgekeurd door

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort: muis.

Stam: ApoE^{-/-}.

Genotype: inbred.

Motivatie: ApoE^{-/-} muizen ontwikkelen o.i.v. een cholesterolrijk dieet van 16 weken atherosclerotische plaques in de bifurcatie van de arteria carotis. In eerdere studies zijn ook ApoE^{-/-} muizen gebruikt, die reeds belangrijke data in het vooronderzoek hebben opgeleverd w.b. trombusvorming op geruptureerde plaques.

Herkomst: Charles River.

Uiteindelijke bestemming: muis wordt geofferd, bloedvaten worden gebruikt voor verdere (histologische) analyse. Kadaver wordt via CPV afgevoerd.

Soort: Rat.

Stam: Wistar Wild type.

Genotype: Inbred.

Motivatie: Wild type ratten ontwikkelen een aneurysma over een periode van 3-4 weken na een locale infusie van elastase in een afgeklemd gedeelte van de abdominale aorta.

Herkomst: Charles River

Uiteindelijke bestemming: rat wordt geofferd, bloedvaten worden gebruikt voor verdere (histologische) analyse. Kadaver wordt via CPV afgevoerd.

7b. Sexe

Voor de experimenten zullen zowel mannelijke als vrouwelijke muizen en ratten gebruikt worden daar het geslacht geen invloed heeft op de atherosclerose en trombotische processen.

7c. Aantallen

Protocol 1: 6 interventies in 16 dieren (groep 1) en 6 groepen van 3 dieren = 114 muizen

Protocol 2: 6 interventies in 16 dieren (groep 1) en 6 groepen van 3 dieren = 114 ratten

Protocol 3: voor elke twee dieren van protocol 1 en 2 wordt bloed van één donordier geïsoleerd voor de labeling van plaatjes. Dit resulteert in een aantal van 57 muizen en 57 ratten.

Protocol 4: per stam: **16 groepen van 8 dieren = 128 muizen.**

Totaal: 114 + 57 + 128 = 299 ApoE^{-/-} muizen

: 114 + 57 = 171 Wistar ratten

Statistische onderbouwing: voor het berekenen van de groepsgrootte (N) is gebruik gemaakt van de formule van L. Sachs voor het toetsen van het verschil tussen twee gemiddelden. $N = 2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 \times (\sigma/\delta)^2$, hierin is $2(z_{\alpha/2} - z_{\pi})^2 = F$. Voor α = onbetrouwbaarheidsdrempel = 0,05 en π = onderscheidingsvermogen = 80% is $F_{0,80} = 15,7$. Dus $N = 15,7 \times (\sigma/\delta)^2$. σ = standaarddeviatie en δ = relevant gemeten verschil; σ en δ zijn voor elk protocol anders. Uit ervaring verwachten wij 20% uitval vanwege a) vroegtijdig overlijden tijdens microscopie, b) afwezigheid van geschikte plaques of aneurysmas. De groepsgrootte wordt hiervoor gecorrigeerd met de formule $(a-0,2a) = N$.

Protocol 1 en 2 (identieke interventies in muis en rat): δ = verschil in trombus grootte = 100 μm^2 , σ = 90. Dit resulteert in $N = 12,7$. **Uitvalscorrectie: $(a-0,2a) = 12,7$, dus $a = 15,9$ (afgerond 16).** **Protocol 3**: Het aantal donormuizen en ratten is de helft van dat van protocol 1 (2 experimenten per dag). Dit is noodzakelijk om voldoende bloedplaatjes te isoleren en fluorescent te labelen, en die vervolgens in de donor muis/rat worden toegediend. De thrombus vorming in de donor muis/rat kan alleen gevisualiseerd worden dmv de toegediende gelabelde plaatjes en daarom dient de concentratie zo hoog mogelijk te zijn. **Protocol 4**: Perfusie: δ = verschil in oppervlaktebedekking van trombi = 10, σ = 6. Dit resulteert in $N = 5,7$. **Uitvalscorrectie: $(a-0,2a) = 5,7$, dus $a = 7,13$ (afgerond 8).**

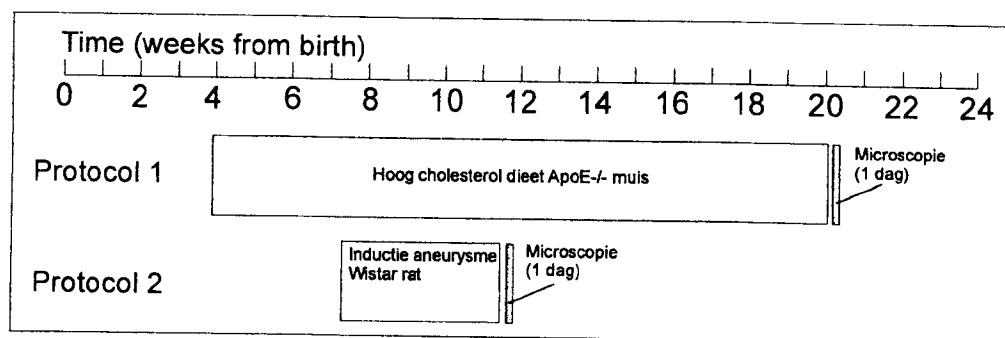
8. Experiment

Protocol 1: Trombusvorming op geruptureerde plaques in de arterie carotis dmv ultrageluid. ApoE^{-/-} muizen worden op 0.15 % cholesterol dieet gezet (dieet W, bekend bij het CPV) vanaf 4 weken tot maximaal 24 weken. De muis wordt onder anesthesie gebracht, de arterie carotis wordt blootgelegd en de muis wordt onder de microscoop gelegd. Fluorescent gelabelde bloedplaatjes (zie protocol 3) of andere relevante probes worden i.v. geïnjecteerd (zie Bijlage 2, Tabel 1). De plaques in de arteria carotis worden gebroken m.b.v. ultrageluid en trombusvorming wordt in real-time gevisualiseerd. Voor volledige beschrijving van de experimentele handelingen wordt verwezen naar de SOPs in Bijlage 1.

Protocol 2: Trombusvorming in abdominale aorta aneurysmas. Wild type wistar ratten worden onder anesthesie gebracht. De volgende procedure vindt aseptisch plaats. De abdominale aorta wordt vrijgelegd en afgeklemd over een lengte van 1cm boven de iliaca. 3 units elastase in 800µL fysiologisch zout wordt tijdens de operatie intraluminaal toegediend in het afgeklemd gedeelte van de abdominale aorta. Frequentie en duur van de blootstelling: 1 keer voor 1 uur. Ratten worden gevolgd maximaal 4 weken post-operatie of tot de dood van het dier. Na 3-4 weken wordt de abdominale aorta vrijgeprepareerd onder algehele narcose. Trombus vorming zal worden geïnduceerd door termale beschadiging van de vaatwand via blootstelling aan een twee-photon laser en bestudeerd met behulp van twee-photon light scanning microscopie (TPLSM). Hiertoe worden fluorecente markers van plaatjes, endotheelcellen en plaquecomponenten toegevoegd (zie Bijlage 2, Tabel 1). Tenslotte worden de arteria carotis gefixeerd met paraformaldehyde en ingebed in paraffine om histologische analyses te kunnen uitvoeren. Voor volledige beschrijving van de experimentele handelingen wordt verwezen naar de SOPs in Bijlage 1.

Protocol 3: Labelen van bloedplaatjes. Bloed wordt afgenomen van de ApoE^{-/-} muis (voor gebruik in protocol 1) en wild type wistar ratten (voor gebruik in protocol 2) en bloedplaatjes worden geïsoleerd. Deze bloedplaatjes worden gelabeld met de fluorescerende probe CFSE (carboxyfluoresceïn succinimidyl ester) voor injectie in steeds twee dieren. Hiervoor kunnen mede oude fokdieren gebruikt worden die geen chirurgische interventie hebben ondergaan.

Protocol 4: Ex vivo Flowproeven. Bloed wordt afgenomen van ApoE^{-/-} muizen en vervolgens worden ex-vivo perfusie-proeven uitgevoerd in microchannels, onder condities die stolling toestaan. Remmers van de adhesie receptoren GPIb/V/IX en α IIb β 3 en de signaleringswegen via ADP en TxA2 worden in vitro aan het bloed toegevoegd, om het werkingsmechanisme te ontrafelen (zie Bijlage 2, Tabel 2).



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie.

Voor alle protocollen geldt: Algehele narcose wordt geïnduceerd d.m.v. i.p. injectie van ketamine en medetomidine. Dit is voldoende voor de eerste 30 minuten. De anesthesie wordt na inductie onderhouden met een continue toediening van ketamine via een miropomp en een s.c. catheter in de nek met 1/30 van het startvolume per minuut.

Dosering:

ApoE-/- muis: 75 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine
Wistar rat: 100 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine.

9b. Pijnbestrijding

Protocol 2: Pre-operatief (- 2hrs) en Post-operatief wordt subcutaan buprenorphine (Temgesic) 0.05 mg/kg toegediend (werkingsduur ± 12 uur). Indien nodig wordt de volgende dag (in de morgen en op het einde van de middag) de injectie van buprenorphine herhaald.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie: protocol 1 en 2: aan het eind van het experiment wordt de muis of rat geofferd d.m.v. overdosis ketamine/medetomidine gevolgd door cervicale dislocatie.

Humane eindpunten: Indien de muis of rat voor of tijdens het experiment aantoonbaar ongerief heeft (zoals niet eten of drinken, gewichtsverlies 15%, onverzorgde vacht, rechtopstaande haren, porfirie, niet actief bewegen of abnormaal (stress)gedrag zoals afbijten poten), dient het dier onmiddellijk geëuthanaseerd te worden. Humane eindpunten worden bijgehouden volgens een animal welfare score sheet zoals bijgevoegd in de bijlage (zie einde van deze aanvraag).

Zorg

10a. Ongerief. Protocol 1, 3 en 4: Een terminaal experiment onder narcose is code 01 (gering ongerief). Protocol 2: Weke delen chirurgie is code 04 (matig/ernstig ongerief).

Protocol	1	2a	2b	3a
Handeling	Anesthesie voor microscopie	Inductie aneurysma Wistar Rat	Anesthesie voor microscopie	Bloedafname ApoE-/- muis I.V.C.
Aard	Algehele narcose	Infusie Elastase in abdom. Aorta (A.A)	Algehele narcose	Verkrijgen volbloed uit inferior vena cava
Ernst	Gering	Matig/ernstig voor 1-2 dagen na infusie	Gering	Gering bij injectie verdoving
Duur	2-3 uur	3-4 weken	2-3 uur	15 minuten
Frequentie	1x	1x	1x	1x
Totale ongerief	Gering	Matig/ernstig	Gering	Gering

Protocol	3b	4
Handeling	Bloedafname Wistar rat I.V.C.	Bloedafname ApoE -/- muis
Aard	Verkrijgen volbloed uit inferior vena cava	Verkrijgen volbloed via orbita punctie
Ernst	Gering bij injectie verdoving	Gering bij injectie verdoving
Duur	15 minuten	15 minuten
Frequentie	1x	1x
Totale ongerief	Gering	Gering

10b. Welzijnsevaluatie. Uit eerdere experimenten (dec-nr 2005-138) is gebleken dat mbt protocol 1, 3 en 4 de muizen weinig ongerief ondervinden. Voor de ratten in protocol 2 wordt meer ongerief verwacht. Ervaring mijst uit dat in de periode na de chirurgische procedure er geen tekenen van ongerief zijn (anorexia, slaapzucht, verminderde mobiliteit, gewichtsverlies). Een klein aantal dieren (<5%) heeft soms verlamingsverschijnselen aan de achterpoten vanwege de noodzaak om de ilicia af te klemmen tijdens de procedure van aneurysme inductie. Monitoring en de frequentie van observatie/behandeling: dagelijks bijhouden van

pijnverschijnselen en / of stress zoals twitch, wincing en wet dog shake. Als symptomen van parese/paralyse/stuwing/thrombus/ecrose zich voordoen zal het dier worden geëuthanaseerd.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen en ratten worden sociaal gehuisvest en verzorgd door de Centrale Proefdier Voorziening (CPV) van de UM. De muizen en ratten kunnen gehuisvest worden in standaard kooien, ze krijgen standaard (ratten) en cholesterolrijke (ApoE^{-/-} muizen) voeding en water van het CPV en ze kunnen ad libitum eten en drinken. De experimenten worden verricht op het laboratorium. Bij calamiteiten dient de verantwoordelijk onderzoeker gewaarschuwd te worden.

12. Deskundigheid

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door of onder begeleiding van VO (art. 9). Zij heeft veel ervaring en is zeer bekwaam in het doen van de ingrepen beschreven in de SOPs. Het plaque rupture model is door haar ontwikkeld en verfijnd (DEC2005-138 en 2010-125). Het aneurysme model in de wistar ratten heeft de VO geleerd onder het toezicht van (universiteit Luik) die zeer ervaren is met deze techniek en ethische goedkeuring geniet van de Universiteit Luik voor deze procedure opvraagbaar op aanvraag). zal zelf geen handelingen verrichten in dit protocol. Andere uitvoerenden (allen art. 9) zullen de handelingen beschreven in de SOPs gaan aanleren en uitvoeren onder voortdurend begeleidend toezicht van VO.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Voor de SOP's van de protocollen wordt verwezen naar Bijlage 1.

Relevante literatuur

1. Kuijpers M et al. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. J Thromb Haemost. 2009; 7: 152-161.
2. Gawaz M et al. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005; 115: 3378-3384.
3. Virmani R et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Atheroscl Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 1262-1275.
4. van Gils JM et al. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. J Leukocyte Biol. 2009; 85: 195-204.

Bijlage 1:
Standard Operation Procedures

Protocollen

Protocol 1: In vivo rupturing van plaques

In dit onderzoek worden de interacties van bloedplaatjes en leukocyten met gescheurde atherosclerotische plaques bestudeerd in de arteria carotis van 22-24 weken oude ApoE^{-/-} muizen (na 18-20 weken op 0.15 % cholesterol dieet (dieet W, bekend bij het CPV)) met behulp van ultrasnelle multifotonmicroscopie.

Algehele narcose wordt geïnduceerd door middel van i.p. injectie van 75 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine, beide in 1 spuit. Deze narcose is voldoende voor de eerste 30 minuten. De anesthesie wordt na inductie elke 30 minuten onderhouden met ketamine via een s.c. catheter in de nek (1/3 van startvolume). Nadat de narcose is ingetreden:

- muis plaatsen op warmteplaatje (Linkam)
- hals scheren
- rectaalprobe inbrengen om lichaamstemperatuur te meten en middels een warmtelamp en een feedbacksysteem op 37 °C te houden
- catheter (PE10) aanbrengen in staartvene: voor de toediening fluorescent gelabelde bloedplaatjes en fluorescent label leukocyten.
- de muis op de rug leggen en fixeren
- een incisie in de huid van de hals maken
- met fijne prepareerpincetten arteria carotis vrijprepareren, waarbij 3 naastgelegen spieren met hechtdraden opzij gelegd worden.

Hierna wordt het dier overgeplaatst naar de ultrasnelle tweefoton laser scanning microscoop (TPLSM, Leica).

Tijdens het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil (37 °C) gehouden middels een warmteplaatje, de romp van de muis wordt afgedekt met aluminiumfolie. Onder de microscoop wordt de carotis vochtig gehouden met fysiologisch zout. De arterie carotis wordt in beeld gebracht ter hoogte van de bifurcatie. Daarna worden er via de staartvene eerst 1×10^8 fluorescent gelabelde bloedplaatjes (in 100 μ l) toegediend. Vervolgens een fluorescent label voor leukocyten (volume 100 μ l). In enkele muizen zullen geen fluorescent gelabelde bloedplaatjes worden toegediend, maar juist andere fluorescente markers van bloedplaatjesactivatie of stollingscomponenten.

De aanwezige plaques in de arteria carotis van de ApoE^{-/-} muizen worden gebroken met behulp van ultrageluid. Hiertoe wordt een sonicator probe tegen de bifurcatie van het vat geplaatst. Vervolgens wordt met hoge frequentie geluidsgolven (10 sec, 6 kHz) de plaques lokaal gebroken. Hierop volgt dan een trombo-embolische reactie. De microscopische beelden van deze reactie in de arterie worden met de TPLSM vastgelegd op de computer. Na afloop van de meting wordt de muis geofferd door middel van overdosis ketamine en xylazine. Wanneer de bloedstroom volledig gestopt is, worden in situ 3D scans gemaakt van de plaque met de trombus. Indien nodig worden de (beide) arterie carotis uitgenomen, waarna deze worden opgespannen in een orgaanbad en verder bestudeerd met behulp van de TPLSM. De arterie carotis van andere muizen zal worden gefixeerd met paraformaldehyde en ingebed in paraffine om histologische analyses te kunnen uitvoeren.

Protocol 2: Trombusvorming in abdominale aorta aneurysmas

In dit onderzoek wordt trombus vorming onderzocht in abdominale aorta aneurysmas in Wistar ratten met behulp van ultrasnelle multifotonmicroscopie en histologie.

Algehele narcose wordt geïnduceerd door middel van i.p. injectie van 100 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine. Deze narcose is voldoende voor de eerste 30 minuten. De anesthesie wordt na inductie elke 30 minuten onderhouden met ketamine via een s.c. catheter in de nek (1/3 van startvolume). Nadat de narcose is ingetreden zal de volgende procedure onder aseptische condities plaatsvinden:

- rat plaatsen op warmteplaatje (Linkam)
- buik scheren
- rectaalprobe inbrengen om lichaamstemperatuur te meten en middels een warmtelamp en een feedbacksysteem op 37 °C te houden
- de rat op de rug leggen en fixeren
- een incisie in de huid van de buik maken
- met fijne prepareerpincetten abdominale aorta vrijpreparen
- afklemmen van de aorta boven de iliaca
- injectie van 3 units elastase in 800 microliter fysiologisch zout
- verwijderen van de klemmen
- de huid hechten met enkelvoudige resorbeerbare knoophechtingen
- rat bijlaten komen in een verwarmde ruimte met een temperatuur van 30°C.
- **pijnbestrijding:** Post-operatief wordt subcutaan buprenorphine (Temgesic) 0.05 mg/kg toegediend (werkingsduur ±12 uur). Indien nodig wordt de volgende dag (in de morgen en op het einde van de middag) de injectie van buprenorphine herhaald.

Na 3 weken wordt de rat wederom geprepareerd zoals hierboven beschreven en wordt de aneurysme in de abdominale arterie blootgelegd en bestudeerd in vivo met behulp van de TPLSM. Na afloop van het experiment zal de rat geofferd worden door overdosis ketamine/medetomidine gevolgd door cervicale dislocatie. In sommige gevallen wordt de aorta geïsoleerd en gefixeerd met paraformaldehyde en ingebed in paraffine om histologische analyses te kunnen uitvoeren.

Protocol 3: Labeling van plaatjes voor i.v. injectie in protocol 1 en 2

In dit onderzoek wordt bloed afgenomen van muizen (voor protocol 1) en ratten (voor protocol 2).

Algehele narcose wordt geïnduceerd door i.p. injectie:

ApoE^{-/-} muis: 75 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine

Wistar rat: 100 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine.

Hierna wordt een terminale bloed afname gedaan via de inferior vena cava. De bloedplaatjes worden geïsoleerd en gelabeld met 6 µg/ml CFSE (carboxyfluoresceïn succinimidyl ester) voor injectie in steeds twee dieren, waarin trombusvorming wordt opgewekt (protocol 1 en 2).

Protocol 4: Ex vivo perfusie proeven met muizen volbloed.

Muizen worden onder anesthesie gebracht door middel van i.p. injectie van 75 mg/kg lichaamsgewicht (b.w.) Ketamine en 1 mg/kg medetomidine. Hierna wordt bloed afgenomen middels orbita punctie (zie onder) en wordt de muis geofferd door middel van cervicale dislocatie.

In de perfusie proeven wordt volbloed, onder condities die stolling toestaan, geleid door microchannels. Aan het geïsoleerde bloed worden fluorescerende plaatjes en/of relevante fluorescent gelabelde substraten zoals fibrinogeen of annexine A5 toegevoegd. De perfusie vindt plaats in een gesloten flowkamer onder kunstmatig geïnduceerde shear stress gradienten om de arteriële bloed stroom op plaques en aneurysmas te imiteren. Interventies vinden plaats met 50 mg/kg clopidogrel, toegediend oraal minus 24 uur, 200 mg/kg aspirine, toegediend i.v. minus 1 uur en Hirudine 20 mg/kg, toegediend i.v. minus 1 uur. Visualisatie zal plaatsvinden met behulp van confocale microscopie (Zeiss Live7) of ultrasnelle

multifotonmicroscop (Leica TSP5).

Specifieke handelingen

Anesthesie

Dosering:

ApoE^{-/-} muis: 75 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine
Wistar rat: 100 mg/kg lichaamsgewicht (bw) Ketamine en 1 mg/kg (bw) medetomidine.

Deze wordt i.p. toegediend met behulp van een 27G naald op een 1 ml spuit. Deze narcose is voldoende voor de eerste 30 minuten. De anesthesie wordt na inductie elke 30 minuten onderhouden met ketamine via een s.c. catheter in de nek (1/3 van startvolume). Dit is een PE10 catheter waarop een 27G naald bevestigd is. De naald wordt gefixeerd met weefsellijm. Deze PE10 catheter is aangesloten op een 1 ml spuit middels een stompe 27G naald.

Canulatie staartvene (voor muis en rat)

De linker of rechter staartvene wordt aangeprikt met een 27G naald die gekoppeld is aan een PE10 catheter. De naald wordt gefixeerd met weefsellijm. Deze canulatie wordt gebruikt voor de toediening van gelabelde plaatjes of mosters in tabel 2.

Bloedafname (protocol 3)

Bloed wordt afgenomen in ApoE^{-/-} muizen en Wistar ratten. Onder algehele narcose middels ketamine en medetomidine (zie hierboven), wordt de inferior vena cava blootgelegd om bloed af te nemen. Er wordt zo veel mogelijk bloed afgenomen (~1 ml voor muis en ~10 ml voor rat). Hierna wordt het dier direct geofferd door middel van cervicale dislocatie.

Bloedafname (protocol 4)

Muis (voor gebruik in protocol 4):

Onder algehele narcose middels 75 mg/kg Ketamine en 1 mg/kg medetomidine wordt met een glazen capillair via de mediale ooghoek door de conjunctiva heen de venenplexus achter het oog aangeprikt, terwijl de halsader wordt gestuwd. Er wordt zo veel mogelijk bloed (700-900 µl) afgenomen. Hierna wordt de muis geofferd door middel van cervicale dislocatie.

Bijlage 2:

Tabel 1: Experimentele groepen protocol 1 en 2. ApoE^{-/-} Muizen en Wistar ratten

Fluorescent label:

Groep 1: CFSE-gelabelde bloedplaatjes (protocol 3).

Groep 2-7: fluorescent antilichamen / probes; alleen aantonen aanwezigheid in trombus en/of plaque, 3 muizen/groep volstaat

Groep	Interventie en/of extra fluorescent label	Effect
1a	Fysiologisch zout	Controle
1b	Aspirin (50 mg/kg)	Blokkeert plaatjes activatie via TxA2
1c	Clopidogrel (200 mg/kg)	Blokkeert plaatjes activatie via ADP
1d	Hirudin (20 mg/kg)	Blokkeert stolling via thrombine inactivatie
1e	Aspirin + Clopidogrel	Combinatie van bovenstaande
1f	Aspirin + Clopidogrel + Hirudin	Combinatie van bovenstaande
2	Syto84	Labelt celkernen in vaatwand
3	Gelabeld Annexine A5	Bindt aan fosfatidylserine (PS)
4	Gelabeld Fibrinogeen/Antilichaam α IIb β 3	Bindt aan integrine α IIb β 3
5	Gelabeld P-Selectine antilichaam	Bindt aan P-Selectine
6	QD585-CNA35	Bindt aan collageen
7	Gelabeld CD31	Bindt aan endotheelcellen

Tabel 2: Experimentele groepen protocol 4. Alleen muizen. (alle labels en antagonisten worden in vitro toegevoegd).

Groep	Interventie	Effect	Fluorescent label voor:
1	Vehicle	Controle	Plaatjes
2	Vehicle	Controle	Plaatjes en fibrinogeen
3	Vehicle	Controle	P-selectine en fosfatidylserine
4	Vehicle	Controle	Intracellulair calcium
5	Aspirine	Remmer TxA2 generation	Plaatjes
6	Aspirine	Remmer TxA2 generation	Plaatjes en fibrinogeen
7	Aspirine	Remmer TxA2 generation	P-selectine en fosfatidylserine
8	Aspirine	Remmer TxA2 generation	Intracellulair calcium
9	Clopidogrel	Remmer ADP activatie	Plaatjes
10	Clopidogrel	Remmer ADP activatie	Plaatjes en fibrinogeen
11	Clopidogrel	Remmer ADP activatie	P-selectine en fosfatidylserine
12	Clopidogrel	Remmer ADP activatie	Intracellulair calcium
13	Aspirine+Clopidogrel	Combinatie hierboven	Plaatjes
14	Aspirine+Clopidogrel	Combinatie hierboven	Plaatjes en fibrinogeen
15	Aspirine+Clopidogrel	Combinatie hierboven	P-selectine en fosfatidylserine
16	Aspirine+Clopidogrel	Combinatie hierboven	Intracellulair calcium

Animal Welfare Score Sheet

Dec number:.....
surgery:.....

Date of treatment/

Animal number:.....
surgery:.....

Treatment/

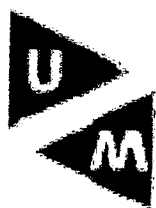
Exam interval:
biotechnician/surgeon:.....

Initials

Date														
Day after treatment/ surgery (1,2,3 etc.)														
Body weight														
Score normal is 0, score 1,2,3 for ↑ in severity (see description p.t.o.)														
Activity														
Movement														
Nest building (mouse)														
Coat/ skin														
Hydration														
Breathing														
Faeces														
Abnormalities/comments:														
Posture														
Abnormalities/comments:														
Surgery site/ wound/ treatment site														
Oedema														
Necroses														
Abnormalities/comments:														
INITIALS:														

	Description			
	0	1	2	3
Activity	Normal	Isolated, less activity	Inactive or overactive, Abnormal posture	Morbid, lifeless
Movement	Normal	Slightly uncoordinated/ Abnormality	uncoordinated, walking on toes	Staggering, paralysis, Limping, seizing, tremor, Reluctant to move
Nestbuilding (mouse)	Normal Nest present	Tissue moved, a bit torn apart	Tissue moved, but nest not present	Nest not present, Didn't touch anything to make a nest
Coat/skin	Normal	Rough lack of grooming slight dry skin	Ill-groomed, small wounds, piloerection (starey coat), dry white skin, Red/brown eye nose(porfyrie), Pink staining of the neck	Red skin, black skin, Hair loss, inelastic white skin, wounds, Discharge, Color skin pale/blue/yellow, Inflammation
Hydration	Normal	Skin less elastic (delayed +/-)	Skin tents(delayed +)	Skin tents(delayed ++), eyes sunken
Breathing	Normal	Rapid, shallow	Rapid, abdominal, Audible breathing	Respiration disorder, Laboured/pumping, blue Breathing with open mouth
Faeces	Normal	Moist faeces, Polyurie (excessive urine production)	Diarrhoea, abnormal urine (volume/colour)	Uncontrolled Diarrhoea, Blood in faeces, No faeces, Nil urine, blood in urine
Posture	Normal	Back arched, hunched Belly press (stretching)	Stagger (sudden loss of balance/gait), twitch (sudden spasm of flank muscle), Writhing (contraction of belly)	Fall (falls over), circling
Surgery site/ wound/ treatment site	Normal, healing	Sutures / clips ok, slight Bleeding, a bit red	Sutures / clips not ok, Discharge, gap forming	Bleeding heavily, wound reopened, very red, wound necroses, Discharge ++
Oedema	Normal, no oedema	Slight collection of abnormal amounts of fluid in the tissues, a bit puffy swelling	collection of abnormal amounts of fluid in the tissues, ascites	Heavily collection of abnormal amounts of fluid in the tissues
Necroses	Normal, no necroses	Dark colored skin	Small dark/black spot(s) burn, blister	Big dark black spot(s), Large crust

For further explanations of signs see: <http://ahwla.org.uk/site/Tutorials.html>
 Or handbook of clinical signs in rodents and rabbits, Charles river



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: 043

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 01-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming*", is op de DEC vergadering van 25 februari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De aantallen op het voorblad en bij punt 7c stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.
- De DEC verzoekt het ongerief op het voorblad en bij punt 10a in overeenstemming te brengen.
- De DEC verzoekt kolom 3 op te splitsen.
- De DEC verzoekt bij punt 7c bij de uitval niet naar beneden af te ronden.
- De primaire uitleesparameter is het verschil in "trombusgrootte". Mag dit voor zowel rat als muis gelijk zijn? De DEC verzoekt de berekeningen opnieuw maken.
- Bij punt 8-protocol 1- is de DEC van mening dat de duur van de proef niet juist is. De DEC verzoekt dit aan te passen en indien van toepassing ook het voorblad aan te passen. De DEC verzoekt tevens een flowchart toe te voegen.
- Bij punt 9a wil de DEC beter geïnformeerd zijn over de bewaking van de anesthesie en de humane eindpunten. De DEC verzoekt dit aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige.
- De DEC vraagt zich af of 10% gewichtsverlies niet te kritisch is gesteld?
- 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.

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 2011-027, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

DEC

DEC nummer: 2011-027

Geachte -

Mijn projectaanvraag: "*Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming*", is op de DEC vergadering van 25 februari 2011 besproken en ik heb de verzoeken van de commissie punt voor punt aangepast en toegelicht.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- *De aantallen op het voorblad en bij punt 7c stemmen niet overeen. De DEC verzoekt dit in overeenstemming te brengen.*

De aantallen zijn gecorrigeerd op het voorblad

- *De DEC verzoekt het ongerief op het voorblad en bij punt 10a in overeenstemming te brengen.*

Het ongerief is gecorrigeerd in punt 10a naar code 01 (gering).

- *De DEC verzoekt kolom 3 op te splitsen.*

Kolom 3 is opgesplitst in kolom 3a (muis) en 3b (rat).

- *De DEC verzoekt bij punt 7c bij de uitval niet naar beneden af te ronden.*

De uitvalscorrectie is geschat op 20%. Deze vaste waarde wordt niet afgerond en altijd in geheel toegepast in de berekening voor het aantal benodigde dieren. Het uiteindelijke aantal is afgerond naar boven.

- *De primaire uitleesparameter is het verschil in "trombusgrootte". Mag dit voor zowel rat als muis gelijk zijn? De DEC verzoekt de berekeningen opnieuw maken.*

Ondanks dat de rat een groter vaatstelsel heeft verwachten we een vergelijkbare thrombusgrootte in beide dieren. Dit komt omdat de manier van vaatwand beschadiging identiek is in de muis en de rat. Om deze reden is gekozen voor dezelfde berekening voor beide diersoorten.

- *Bij punt 8-protocol 1- is de DEC van mening dat de duur van de proef niet juist is. De DEC verzoekt dit aan te passen en indien van toepassing ook het voorblad aan te passen. De DEC verzoekt tevens een flowchart toe te voegen.*

De duur van de proef is gecorrigeerd op het voorblad tot 16 weken. Deze tijd is inclusief 16 weken hoog cholesterol dieet voor de ApoE^{-/-} muizen en aansluitend 1 dag microscopie. Voor de ratten geldt een minder lange tijd van aneurysme inductie: maximaal 4 weken en aansluitend 1 dag microscopie.

Een flowchart is toegevoegd in punt 8 voor protocol 1 en 2.

- *Bij punt 9a wil de DEC beter geïnformeerd zijn over de bewaking van de anesthesie en de humane eindpunten. De DEC verzoekt dit aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige.*

In overleg met de proefdierdeskundige is besloten om de anesthesie niet elke 30 minuten toe te dienen, maar continu via een infuuspompje en een s.c. catheter in de nek van het dier. De humane eindpunten zoals eerder beschreven in de aanvraag worden via een toegevoegde scorings sheet dagelijks bijgehouden (zie bijlage).

- *De DEC vraagt zich af of 10% gewichtsverlies niet te kritisch is gesteld?*

Een gewichtverlies van 10% is gebaseerd op ervaringen van voorgaande protocollen. Ondanks dat is het wellicht beter om het kritische gewichtsverlies naar 15% te verhogen. Deze aanpassing zijn doorgevoerd in de aanvraag.

- *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.*

Elke handeling per protocol is in een tabel weergegeven.

Ik vertrouw erop u hierbij voldoende geïnformeerd te hebben. Mochten er nog punten onduidelijk zijn dan hoor ik graag van u.

Hoogachtend,



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: 043-

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

De **herziene versie** van uw projectaanvraag: "*Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Op het voorblad moet de code voor toestand dier einde experiment, code 01 zijn. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- De berekening van de uitval is niet goed gedaan. De berekende groepsgrootte moet **niet** naar beneden worden afgerond. De DEC verzoekt dit aan te passen.

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 **2011-027**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend.

VOORZITTER DEC-UM

Aan:

DEC

DEC nummer: 2011-027

Geachte

Mijn gecorrigeerde projectaanvraag: "*Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken en ik heb de verzoeken van de commissie punt voor punt aangepast en toegelicht.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- *Op het voorblad moet de code voor toestand dier einde experiment, code 01 zijn. De DEC verzoekt dit aan te passen.*

De codes zijn aangepast

- *De berekening van de uitval is niet goed gedaan. De berekende groepsgrootte moet niet naar beneden worden afgerond. De DEC verzoekt dit aan te passen.*

De berekening is gecorrigeerd en de uiteindelijke groepsgrootte is naar boven afgerond. Het aantal dieren voor protocol 4 is hiermee gestegen van 112 naar 128.

Ik vertrouw erop u hierbij voldoende geïnformeerd te hebben. Mochten er nog punten onduidelijk zijn dan hoor ik graag van u.

Hoogachtend,

Aan:

Ons kenmerk
RH/MQ- 199-11

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
07-04-2011

Project: Effect van shear stress gradienten op thrombus vorming.

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: 2011-027
Diersoort: muis en rat
Aantal dieren: 299 muizen en 171 ratten
Einddatum: 05-04-2015

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