

Voorblad werkprotocol CPV
Herziene versie

DECNR:2011-141

Ontvangen: 25-11-2011

DEC goedkeuring#	datum goedkeuring#	type aanvraag ²	VROM/GGONR ³	LNVCBDNR ⁴
Ja / Nee	30-11-2011		IG 01-294	

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	162100	
----------------------	--	--	--------------	--------	--

Titel van het onderzoek: Apoptose beeldvorming in atherosclerose muismodel met behulp van microSPECT en CT

startdatum	01-12-2011	einddatum	30-11-2015	Ruim plannen, max 4 jaar
------------	------------	-----------	------------	--------------------------

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E_mail	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)		043-3881657 06-47777776		Art.9	)
2. Vervanger VO (VVO)		74738		Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷		81533		Art.9	
4. overige uitvoerenden		81270 74738		Art. 12 Art.9	
5.PI		74746			

Diergroep	PL1a	PL1b	PL2	A	B	C	D
ctrl/exp/sham	Cntrl	exp	exp	ctrl	exp	exp	exp
Diersoort	01	01	01	01	01	01	01
Stam	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6	C57Bl6
Herkomst (leverancier)	01	01	01	01	01	01	01
Aantal	3	3	6	15	11	11	11
Geslacht	mn1	mn1	mn1	mn1	mn1	mn1	mn1
Zijn de dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	Ja
Leeftijd/gewicht	± 12 wkn	± 12 wkn	± 12 wkn	± 12 wkn	± 12 wkn	± 12 wkn	± 12 wkn
Doel van de proef *	31	31	31	31	31	31	31
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	04	04	04	04	04	04	04
Mate ongerief *	04	04	04	03	04	04	04
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

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

Titel: Apoptose beeldvorming in atherosclerose muismodel met behulp van microSPECT en CT

1. Doel van de proef.

Het **doel** van dit onderzoek is om met behulp van Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) in combinatie met Computed Tomography (CT) apoptosis in beeld te brengen in atherosclerotische plaques. In eerder onderzoek is al aangetoond dat apoptotische cellen een goede biomarker zijn voor de diagnose van onstabiele fenotypen [1].

Hiervoor wordt een recent ontwikkeld mutant AnxA5 (His-cys2-AnxA5) gebruikt dat op een specifieke plaats kan worden gelabeld met ^{99m}Tc en daardoor een hogere stabiliteit en affiniteit heeft voor PS in vergelijking met eerder gebruikte en random gelabelde AnxA5 (^{99m}Tc -HYNIC-AnxA5) [2].

Dit geoptimaliseerde ^{99m}Tc -AnxA5 zouden we in vivo willen evalueren in atherosclerotische plaques. Hiervoor kunnen we gebruik maken van recent aangeschafte u-SPECT dat met een superieure resolutie en sensitiviteit in vivo beelden kan maken. De coreregistratie met Computed Tomography (CT) biedt de gelegenheid moleculaire informatie te combineren met anatomische structuren.

Hiervoor zullen plaques geïnduceerd worden door middel van collarplaatsing om beide carotiden in ApoE-/- muizen op vetdieet. Op 3 tijdstippen na collarplaatsing (3,6,9 weken) zouden de in vivo binding van ^{99m}Tc -AnxA5 aan de plaques willen bestuderen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Atherosclerose is één van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse Wereld. Daarom is het van groot belang dat risicovolle atherosclerotische laesies kunnen worden gediagnosticeerd. De aanwezigheid van apoptose is één van de kenmerken van een risicovolle atherosclerotische laesie. Eerder onderzoek heeft toegelaten het ^{99m}Tc -gelabelde AnxA5 te optimaliseren hetgeen de mogelijkheid biedt om op een meer gevoelige manier naar apoptose te kijken en daardoor een verbeterde karakterisatie en prognose te doen van atherosclerotische plaques.

3. Alternatieven

Vanwege de aard van het onderzoek (vorming van atherosclerose in vivo) is het niet mogelijk om in vitro alternatieven toe te passen.

Het enige bestaande alternatief is humaan onderzoek bij mensen waarbij reeds atherosclerose werd vastgesteld. Afgezien van medische en ethische problemen, is de standaardisatie van het ziekteproces, die vereist is voor het valideren van de techniek in de klinische setting, hier erg beperkt of zelfs onmogelijk.

4. Ethische afweging

Cardiovasculaire ziekten zijn de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse wereld. Volgens de European Public Health Alliance (EPHA) zijn 41% van de doodsoorzaken in Europa cardiovasculair gerelateerd. Het ingeschatte ongerief van de proefdieren in deze aanvraag weegt ons inziens niet op tegen het belang van het vinden van een goede moleculaire imaging probe die een onstabiele plaque in beeld brengt op een niet-invasieve manier en zo de patiëntstatus sterk verduidelijkt, wat op zijn beurt de behandeling ten goede komt en zo menselijke levens kan redden.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

In de moderne maatschappij zijn cardiovasculaire aandoeningen één van de belangrijkste oorzaken van mortaliteit en morbiditeit. De meeste klinische manifestaties worden veroorzaakt door orgaancomplicaties, die het gevolg zijn van het fragmenteren van geruptureerde atherosclerotische plaques. Gegevens uit de literatuur hebben geleid tot de hypothese dat apoptose beeldvorming het onderscheid tussen stabiele en geruptureerde plaques zou kunnen maken.

Aangezien AnxA5 bindt aan apoptotische cellen biedt het radiolabelen van AnxA5 met ^{99m}Tc de mogelijkheid om heel gevoelig en aan een hoge resolutie met SPECT in vivo beeldvorming van apoptose toe te laten. [1, 4, 5, 6]. De nieuwe mogelijkheden om het recent aangeschafte u-SPECT toestel te combineren met CT biedt daarenboven de optie om ook anatomische informatie te krijgen van de vaatwand.

De onderzoeken met ^{99m}Tc -HYNIC-AnxA5 tot nu toe toonden een suboptimale target-to background ratio waarschijnlijk door de mogelijke interferentie van het radiolabel met het proteïne. Daarom werden recent nieuwe AnxA5 mutanten ontwikkeld die op een site-specifieke wijze gelabeld kunnen worden met ^{99m}Tc [2]. Een verhoogde affiniteit voor PS en superieure stabiliteit van het ^{99m}Tc -His-AnxA5 toonde aan dat deze probe een betere beeldvorming van apoptose in vivo mogelijk maakt [2].

Om na te gaan of deze probe op een gevoelige en kwantitatieve manier apoptose in beeld kan brengen met behulp van SPECT/CT worden ApoE-/- muizen na collar plaatsing. Hoewel deze modellen geen onstabiliteit vertonen in de plaque bezitten ze wel een aantal karakteristieken van vulnerable plaques zoals bepaalde mate van apoptose hetgeen wij in dit project in vivo in beeld zouden willen brengen.

Deleted: 1

6. Wetenschappelijke beoordeling

Eerder onderzoek in dit domein uitgevoerd door de groep aan de universiteit van
Maastricht wordt beschreven in een aantal interessante artikels en reviews waarin de interesse voor
apoptose beeldvorming in gevoelige plaques en de nood aan 'betere' probes voor
beeldvormingsdoeleinden wordt beschreven. Het hoofd van dit aboratorium heeft
dit project mee opgestart en goedgekeurd. Daarenboven is het diensthoofd 3, PI
van dit project en heeft hij dit project nagelezen en goedgekeurd.

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Er is voor de C57Bl6 ApoE -/- muis als proefdier gekozen, omdat dit een goed en veel gebruikt model voor atherosclerose is, dat dankzij de huidige moleculair biologische technieken beschikbaar is gekomen. Het collargeïnduceerde ApoE -/- muizenmodel waarbij de muizen op vetrijk dieet worden gezet, is een algemeen geaccepteerd model voor atherosclerose. Uiteindelijk zullen de dieren worden opgeofferd ten behoeve van de histologie.

7b. Sexe

Het is beschreven dat geslacht invloed heeft op de ontwikkeling van plaques bij muizen. Het effect beschreven in de literatuur is niet eenduidig; vrouwtjes muizen hebben soms grotere en soms kleinere plaques dan mannetjes uit hetzelfde nest (Tangirala et al J Lipid Res. 1995;36:2320-2328, Caligiuri et al Atherosclerosis. 1999;145:301-308 en van Ree et al, Atherosclerosis 1994: 111;25-37). Hieruit bleek ook dat hormonen als oestrogenen en testosteron invloed kunnen hebben op de expressie van lipidenmetabolisme gerelateerde genen (ApoA1, ApoB en LDL-receptor, ook betrokken bij atherosclerose) (Tang et al, J lipid Res 1991;32;1571-85). Recent heeft Whitman et al. (J Interferon Cytokine Res 2002: 22; 661-70) beschreven dat er in IFN-gamma (regulator van immuunresponse) deficiënte ApoE-/- muizen wel effect was op de ontwikkeling van atherosclerotische laesies in de mannelijke, maar niet in de vrouwelijke muizen. Gezien deze literatuurgegevens zouden we willen voorstellen mannelijke muizen te gebruiken.

7.c. Aantallen

Pilootstudies

Alvorens het daadwerkelijke experiment zal worden uitgevoerd zullen er twee piloot studies worden verricht. Met behulp van deze piloot studies zal bepaald worden hoe de contraststof zich verdeelt over het lichaam (piloot studie 1) en zal een optimaal tijdstip uitgekozen worden voor beeldvorming van de bloedvat wand.

Ten tweede gaan trachten we op dit optimaal tijdstip na contrasttoediening de atherosclerotische plaques in beeld brengen met gecombineerde SPECT-CT (piloot studie 2).

- **Piloot studie 1 (6 muizen):** In deze piloot studie zullen de muizen worden geïnjecteerd met ^{99m}Tc-AnxA5. Een whole body SPECT scan zal dan de biodistributie weergeven van de tracer. De dieren worden sequentieel gescand van 0-60min pi, 180-210 min pi en 360-390 min pi.

Pilot 1a (3 muizen) Controle dieren zonder collarplaatsing

Pilot 2b (3 muizen) Atherosclerose dieren 6 weken na collarplaatsing

- **Piloot studie 2 (6 muizen):** In deze pilootstudie zal het gebruik van de microCT en de combinatie met microSPECT worden geoptimaliseerd. Dit zal gebeuren in atherosclerose dieren 6 weken na collarplaatsing.

Pilot 2a (3 muizen) In deze piloot studie zal eerst worden gekeken naar de optimale parameters voor microCT beeldvorming van carotiden in de muis. Hierbij zal CT contrast worden geïnjecteerd en zullen de dieren gedurende een uur na de injectie gescand worden om te kijken naar de ideale timing injectie.

Pilot 2b (3 muizen) Om te kijken of coregistratie tussen SPECT en CT in vivo mogelijk is zal bij een optimaal tijdstip na injectie van de SPECT tracer een SPECT gemaakt worden waarna het CT contrast aan de optimale concentratie zal worden toegediend en geimaged na een bepaalde optimale tijd. Daardoor kan worden nagegaan of het mogelijk is beide modaliteiten te coregistreren in vivo.

Deze pilootstudies laten toe een optimaal tijdstip voor beeldvorming te bepalen en microSPECT-microCT te coregistreren.

Naar aanleiding van de pilootstudie zullen de volgende experimenten worden uitgevoerd. Bij deze experimenten zullen de dieren at random worden onderverdeeld in de verschillende groepen en is het onderzoek geblindeerd door de interventie. Teven zal bij de deze experimenten de ideale afbeeldingstijd en ideale positionering worden gebruikt.

Met de formule van L. Sachs: $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(z\alpha/2 - z\pi)^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$

Dus $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding (σ) wordt geschat op 30%. Deze zal vooral te wijten zijn aan de verschillen tussen de muizen onderling. De plaque-ontwikkeling bij iedere muis na het plaatsen van de collar zal lichtjes variëren bij iedere muis. De variatie die ontstaat door kleine verschillen in het toedienen zal beperkt blijven door de uitgebreide ervaring (Art 12; R. Tinnemans) in het uitvoeren van deze methode. Het beoogde effect (δ) kan moeilijk ingeschat worden. We veronderstellen dat een minimale toename van 40 % traceropname noodzakelijk is om de verhoging in beeld te brengen en te spreken van een succesvolle tracer.

Dit geeft; $n = 15,7 * (30/40)^2 = 8,8$

Uitval wordt geschat op 20%. Dit naar aanleiding van resultaten verkregen uit eerdere experimenten [7]

$(a - 0,2a) = 8,8$ of $0,8a = 8,8$ of $8,8/0,8 = a$

Dus $a = 11$

Aantal groepen = 3

Aantal dieren = 33

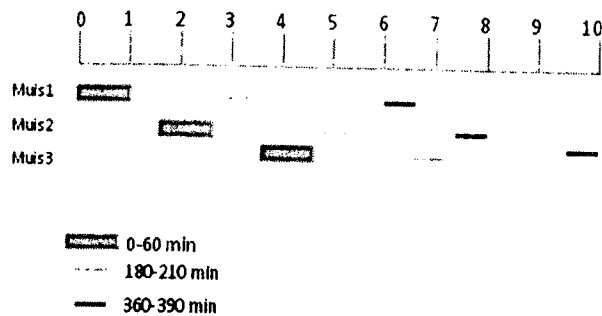
Ter controle zouden we 5 dieren willen includeren per tijdstip (er zijn 3 tijdstippen) = 15 dieren

Aantal dieren: (3 groepen x 11) + 15 control + 12 pilotes = totaal 60 dieren

5 Dierproef

8. Experiment

In de volgende figuur staat piloot experiment 1, waarbij de biodistributie van ^{99m}Tc -AnxA5 (20-50MBq) op verschillende tijdstippen na i.v. injectie bestudeerd wordt, schematisch weergegeven: (pilot 1a betreft ApoE muizen die geen collar kregen terwijl pilot1b ApoE muizen met collar betreft)



In piloot experiment 2a worden de dieren gescand met de microCT. Hierbij wordt de blood pool contraststof Exia 160 (160mg l/ml) iv geïnjecteerd (0.1ml/20g) in muizen zoals voorheen beschreven [8]. Hierna wordt gedurende 1 uur na injectie wordt gekeken naar bloedvat contrast in de microCT.

In pilot 2b wordt de microCT gecombineerd met de microSPECT. Hierbij wordt eerst een microSPECT gepland op het in pilot studie 1 bepaalde ideale tijdstip na injectie van de tracer waarna de microCT wordt uitgevoerd op het in piloot2a experiment bepaalde tijdstip.

Het grote experiment staat hieronder beschreven.

	T = W 0	T = W 3	T = W 6	T = W 9	T = W 12
Groep A: <i>ApoE^{-/-}</i> , n=15	-	-	N=5 SPECT-CT Opofferen voor ex vivo imaging and IHC	N=5 SPECT-CT Opofferen voor ex vivo imaging and IHC	N=5 SPECT-CT Opofferen voor ex vivo imaging and IHC
Groep B: <i>ApoE^{-/-}</i> , n=11	n=11 Plaatsing op westers hoog vet dieet	n = 11 plaatsing collar zoals eerder beschreven in SOP	N=11 SPECT-CT Opofferen voor ex vivo imaging and IHC	-	-
Groep C: <i>ApoE^{-/-}</i> , n=11	n=11 Plaatsing op westers hoog vet dieet	n=11 plaatsing collar zoals eerder beschreven in SOP	-	N=11 SPECT-CT Opofferen voor ex vivo imaging	-

Groep D: <i>ApoE^{-/-}</i> , n=11	n=11 Plaatsing op westers hoog vet dieet	n=11 plaatsing collar zoals eerder beschreven in SOP	-	and IHC	N=11 SPECT-CT Opofferen voor ex vivo imaging and IHC
---	---	--	---	---------	---

IHC = immunohistochemistry

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Collar plaatsing, i.v. injecties, SPECT en CT scans worden onder gasanesthesie uitgevoerd.

Inductie anesthesie met 3-4% isofluraan.

Onderhouden van anesthesie tijdens operatie, intraveneuze injecties en microSPECT-CT met 2-2.5% isofluraan

9b. Pijnbestrijding

Pre-operatief wordt er pijnbestrijding gegeven 30 min voor inductie van de anesthesie, Temgesic (buprenorphine hydrochloride, 0.05-0.1 mg/kg, s.c., werkingsduur 8-12uur). Tot 2 dagen na de operatie wordt 0.05-0.1 mg/kg, s.c., toegediend elke 8-12uur.

Carprofen wordt in deze studie niet gegeven omwille van het NSAID effect dat kan interferen met de inflammatoire respons en kan leiden tot verhoogde bloeddruk hetgeen we willen vermijden in ons atherosclerose model.

Bij i.v. injecties en microSPECT-CT imaging worden de dieren met behulp van isofluraan verdoofd (licht analgetisch effect, voldoende voor de weinige toegebrachte pijn).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De dieren zullen geëuthanaseerd worden na afloop van het experiment door middel van een intraperitoneale injectie van pentobarbital (200 mg/kg).

Humane eindpunten: euthanasie zal worden toegepast in geval van extreme vormen van ongerief: geen reacties op geluidsignalen, zich slap laten hangen na oppakken, staken van de zelfverzorging, cirkelgang en gewichtsafname > 20%/dag of >10 % over het ganse experiment.

Bij onduidelijkheden of mogelijke ziekte wordt contact opgenomen met art.14 functionaris.

10a. Ongerief

Handeling	Tijdsduur (min)	Frequentie	Ongeriefscore
Plaatsing collar	15	1	4
iv-injectie voor de microSPECT onder volledige anesthesie en analgesie	Max 5	1	3
iv-injectie voor de microCT onder volledige anesthesie en analgesie	Max5	1	3
microSPECT onder volledige anesthesie en analgesie	Max 1uur	1 (PL1 3x)	3
microCT onder volledige anaesthesie en analgesie	Max 1uur	1	3
Opofferen muizen voor ex vivo imaging en IHC	Max 10 min	1	2

Het geheel wordt ingeschat per groep:

PL1a Totaal ongerief: Matig; door scannen onder anesthesie

PL1b Totaal ongerief: Matig-ernstig; door plaatsing collar en meermaals scannen onder anesthesie

PL2a en b Totaal ongerief: Matig-ernstig; door plaatsing collar en meermaals scannen onder anesthesie

Groep A Totaal ongerief: Matig; door scannen onder anesthesie

Groep B Totaal ongerief: Matig-ernstig; door plaatsing collar en scannen onder anesthesie

Groep C Totaal ongerief: Matig-ernstig; door plaatsing collar en scannen onder anesthesie

Groep D Totaal ongerief: Matig-ernstig; door plaatsing collar en scannen onder anesthesie

10b. Welzijnsevaluatie

Het ongerief geassocieerd met de plaatsing van de collar wordt geschat op matig-ernstig door het gebruik van accurate pijnbestrijding. Er zal een welzijnsschrift bijgehouden worden om het welzijn van de dieren te analyseren. Pre-operatief wordt er pijnbestrijding gegeven 30 min voor inductie van de anesthesie, Temgesic (buprenorphine hydrochloride, 0.05-0.1 mg/kg, s.c., werkingsduur 8-12uur). Tot 2 dagen na de operatie wordt 0.05-0.1 mg/kg, s.c., toegediend elke 8-12uur.

De intraveneuze injecties en de scans worden onder anesthesie en analgesie uitgevoerd en worden daarom geschat op matig.

De dieren zullen opgeofferd worden door middel van i.p. injectie van pentobarbital, hetgeen wij eveneens als gering ongerief inschatten

11. Verzorging en huisvesting

Er zullen filtertopkooien gebruikt worden. De muizen kunnen met meerderen samen geplaatst worden. Een westers hoog vet dieet zal ad libitum verstrekt worden. Assistentie van het CPV personeel wordt verzocht voor de verzorging van de dieren.

12. Deskundigheid

Het plaatsen van de collars zal uitgevoerd worden door

art 12 (zie voorblad).

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Operatie, plaatsen van collars:

- Pre-operatief wordt er pijnbestrijding gegeven 30 min voor inductie van de anesthesie, Temgesic (buprenorphine hydrochloride, 0.05-0.1 mg/kg, s.c., werkingsduur 8-12uur). Tot 2 dagen na de operatie wordt 0.05-0.1 mg/kg, s.c., toegediend elke 8-12uur.
- De muis wordt in een kamertje verzadigd met 3-4.0% isofluraan gemengd met perslucht onder anesthesie gebracht en met 2-2.5% isofluraan gemengd met perslucht onder anesthesie gehouden. De muis wordt gefixeerd en op 36.5 °C gehouden via een gethermostreerde 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 rechter zijde van de muis bloot te liggen.
- De carotis communis wordt vrijgeprepareerd van het omringende bindweefsel waarbij erop gelet wordt de nervus vagus niet te beschadigen. Onder de carotis communis worden drie ligaturen (hecht-zijde 5-0) klaargelegd, waarmee later de collar kan worden bevestigd. Dit wordt voor de linker zijde herhaalt.
- Een 2 mm lange collar (Silastic tubing met een binnendiameter van 0.3 mm, overlangs doorgesneden) wordt om de a. carotis communis gelegd en met de drie ligaturen vastgelegd.
- De m.sternocleidomastoideus wordt teruggeplaatst en de huid over de wond wordt gesloten (vicryl 5.0).
- De muis laten bijkomen in een temperatuur gereguleerde kamer (30 graden).

Handelingen ten behoeve van SPECT en CT:

- Sedatie met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie: 3-4%; onderhoud: 2-2.5%). Het anestheticum wordt toegediend via een mondkapje met behulp van een combinatie van perslucht en O₂ als dragergas (2L/min). De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex. De ogen van de muis worden behandeld met oogzalf om uitdroging te voorkomen.
- Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de muis gepositioneerd wordt onder voortdurende bewaking van de ademhalingsfrequentie.
- Vervolgens zal de tracer worden toegediend via de staartvene.
- De muis wordt in het SPECT systeem geplaatst en zal gedurende maximaal 1 uur continu gescand worden. Het dier is gepositioneerd in een drager, waarin het warmtematje en de anesthesietoevoer zijn bevestigd.
- Na de microSPECT wordt van de dieren een microCT gemaakt door het bedje te transporteren naar de microCT waar via de staartvene contraststof wordt toegediend.
- Uiteindelijk wordt het proefdier verwijderd uit de CT scanner en onder anesthesie d.m.v. een overdosis pentobarbital (1:5 verdund in NaCl, 150 mg/kg (~200 ul i.p) opgeofferd.

Relevante literatuur

- [1] Laufer, E.M., et al., Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(2): p. 95-104.
- [2] De Saint-Hubert M, Mottaghy FM, Vunckx K, Nuyts J, Fonge H, Prinsen K, et al. Site-specific labeling of 'second generation' annexinV with 99mTc(CO)₃ for improved imaging of apoptosis in vivo.
- [3] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of

phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* Apr 1 1992;148(7):2207-2216.

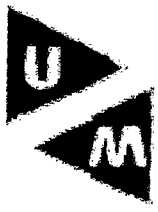
[4] Schutters K, Reutelingsperger C. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis*, 2010. 15(9):1072-82.

[5] Isobe S, Tsimikas S, Zhou J, Fujimoto S, Sarai M, Branks MJ, et al. Noninvasive imaging of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient and low-density-lipoprotein receptor-deficient mice with annexin A5.

[6] Kietselaer B, Reutelingsperger CP, Heidendal GA, Daemen MJ, Mess WH, Hofstra L, et al. Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. *N Engl J*, 2004. 1;350(14):1472-3.

[7] Bot, I., et al., Serine protease inhibitor Serp-1 strongly impairs atherosclerotic lesion formation and induces a stable plaque phenotype in ApoE-/- mice. *Circ Res*, 2003. 93(5): p. 464-71.

[8] Willekens I, Lahoutte T, Buls N, Vanhove C, Deklerck R, Bossuyt A, de Mey J. Time-course of contrast enhancement in spleen and liver with Exia 160, fenestra LC and VC. *Mol Imaging and Biol*, 2009. 11(2):128-35.



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, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Apoptose beeldvorming in atherosclerose muismodel met behulp van microSPECT en CT*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC heeft de indruk dat soortgelijke experimenten eerder zijn uitgevoerd (AnV imaging in muis modellen van atherosclerose). De DEC verzoekt eerder uitgevoerde experimenten (van de eigen groep en in literatuur) te vermelden. Dit geldt ook voor het reeds gepubliceerde werk in patiënten met atherosclerose (AnV imaging in symptomatische patiënten met een plaque in de carotide).
- De DEC merkt op dat er gekozen wordt voor het collar induced athero-model. Dit om de instabiele plaque en stabiele plaque te kunnen onderscheiden. Echter, in muizen komt de instabiele plaque niet voor. De DEC vraagt de onderzoekers uit te leggen welke metingen er gedaan worden om "kenmerken" van de onstabiele plaque aan te tonen.
- Het doel van de proef is voor de DEC niet helder. Er worden verschillende doelstellingen geformuleerd. De DEC verzoekt de overwegingen hier genoemd bij punt 1 en 2 in perspectief te zetten en duidelijk aan te geven wat het exacte doel en beoogde inzichten zijn van de voorgestelde experimenten. Dit is nu onvoldoende duidelijk, hetgeen de ethische afweging door de DEC in de weg staat. Om die reden is het protocol niet inhoudelijk behandeld.

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 2011-141, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend

Voorzitter DEC-UM

Geachte leden van de DEC Maastricht,

4-november-2011

Aangezien het doel van de proef niet helder was hebben we het doel meer gespecificeerd en ook de wetenschappelijke onderbouwing meer uitgebreid beschreven in de DEC aanvraag.

Niet alleen zouden we hier met een nieuwe en verbeterde ^{99m}Tc -AnxA5 probe werken we zouden ook met een recent aangekocht toestel u-SPECT (MiLabs) aan een hoge gevoeligheid en sensitiviteit in vivo beelden willen maken in combinatie met CT imaging die anatomische informatie van de vaatwand weergeeft.

De referentie die de optimalisatie van het AnxA5 als imaging probe beschrijft werd geïnccludeerd alsook de een aantal referenties van atherosclerose beeldvorming met ^{99m}Tc -AnxA5. Deze onderzoeken toonde reeds aan dat AnxA5 de mogelijkheid biedt apoptose in beeld te brengen in atherosclerotische plaques maar voor klinische applicaties werd beschreven dat deze probes suboptimale target-to-background ratio hadden.

Daarom is het belangrijk met een geoptimaliseerde AnxA5 probe na te gaan of gevoelige en kwantitatieve in vivo beeldvorming van apoptose in atherosclerose mogelijk is met de nieuwe SPECT/CT beeldvormingstechnieken recent aangekocht aan de universiteit van Maastricht.

Hiervoor zouden ApoE-/- muizen worden gebruikt met collar plaatsing om naar het apoptose proces te kijken. Dit is een goed gekarakteriseerd model en hoewel niet onstabiel vertonen deze plaques kenmerken van onstabiele plaques zoals apoptose. In de DEC aanvraag werd dan ook de nadruk gelegd op het in beeld brengen van apoptose eerder dan het in beeld brengen van onstabiele plaques. Door apoptose op een gevoelige en kwantitatieve manier in beeld te kunnen brengen bestaat echter wel de mogelijkheid om in verdere applicaties een onderscheid te maken tussen onstabiele en stabiele plaques in de toekomst.

Met deze aanpassingen en argumentaties hopen wij het exacte doel en de beoogde inzichten van de voorgestelde experimenten te hebben verduidelijkt.

Vriendelijke groeten,

, MSc PhD



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, 24-11-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie vna uw projectaanvraag: "*Apoptose beeldvorming in atherosclerose muismodel met behulp van microSPECT en CT*", is op de DEC vergadering van 18 november 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) De DEC verzoekt de startdatum op het voorblad aan te passen.
- 2) De DEC merkt op, dat op het voorblad het ongerief van groep A, code 03 is en verzoekt dit aan te passen.
- 3) De DEC verzoekt de namen bij punt 6 te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat er verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 4) Punt 7c- De DEC vraag zich af of de plaque grootte wel de aangewezen uitleesparameter is? Gezien de doelstelling lijkt het SPECT signaal de aangewezen uitleesparameter.

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 2011-141, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend

Voorzitter DEC-UM

25 november 2011

Geachte leden van de DEC Maastricht,

Op basis van de opmerkingen die jullie hebben gemaakt voor DEC aanvraag nummer 2011-141, zijn twee aanpassingen in de DEC gebeurd (in grijs gemarkeerd). Onder punt 6 zijn de namen van de betrokken onderzoekers uitgehaald in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur. Punt 7c is ook aangepast en beschrijft nu dat het beoogde effect moeilijk kan worden ingeschat maar een verhoging van tenminste 40% nodzakelijk is om van een succesvolle tracer te spreken.

Op het voorblad zijn is zowel de startdatum als het ongerief van groep A aangepast (code 03).

Met deze aanpassingen hopen wij uw vragen en opmerkingen te beantwoorden.

Vriendelijke groeten,

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Z. J. J.', is written over a faint, horizontal, wavy line that serves as a separator or guide.

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043. 000000Maastricht
14-12-2011

Project: *Apoptose beeldvorming in atherosclerose muismodel met behulp van microSPECT en CT.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, 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 met de opmerking, dat personen die niet art.9 gecertificeerd zijn, niet zelfstandig mogen participeren in dit onderzoek.**

Bezoekadres

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-141
Diersoort: muis
Aantal dieren: 60
Einddatum: 30-11-2015

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