

# Kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren

bachelor in de agro- en biotechnologie  
afstudeerrichting Dierenzorg  
3<sup>e</sup> stageverslag



Student: Stappers Flore  
Academiejaar 2018-2019  
Begeleidende lector: van Wiele Peggy  
Stagementor: Vanhove Christian

KATHOLIEKE HOGESCHOOL VIVES  
STUDIEGEBIED BIOTECHNIEK

WILGENSTRAAT 32  
B-8800 ROESELARE  
TEL. +32 51 23 23 30  
FAX +32 51 22 82 58

BIO.ROESELARE@VIVES.BE  
WWW.VIVES.BE

INFINITY Lab  
Corneel Heymanslaan 10  
9000 Gent

[http://medisip.ugent.be/?page\\_id=56](http://medisip.ugent.be/?page_id=56)



## Woord vooraf

Dertig leerrijke stagedagen leerden me dat fouten maken niet hetzelfde is als falen. Met de gedachte: “Je leert niet om te werken, maar je werkt om te leren” startte en eindigde ik mijn stage bij INFINITY Lab. Nu ik aan het einde van mijn stageperiode gekomen ben, wil ik graag enkele mensen bedanken die mij tijdens deze fantastische stage en dit stageverslag hielpen.

Allereerst wil ik mevrouw Van Wiele, mijn stagebegeleidster, bedanken voor de goede begeleiding tijdens de stageperiode. Ik kreeg steeds de nodige feedback en tips. Bij elke vraag of moeilijke situatie kreeg ik de ondersteuning die ik nodig had. Hartelijk dank hiervoor!

Daarnaast wil ik ook professor Vanhove bedanken voor de kans die ik kreeg om bij INFINITY Lab stage te mogen lopen. Dankzij professor Vanhove en dr. Benedicte Descamps ontwikkelde ik nieuwe kennis en inzichten in de wereld van de proefdieren. Onder jullie begeleiding kon ik mij in het bedrijf inwerken. Zonder jullie hulp, steun en kennis zou ik mijn eindverslag niet tot een volwaardig eindwerk volbracht hebben.

Ik wil ook zeker de collega's van INFINITY Lab bedanken. Een welgemeende dankuwel voor al de kennis die jullie met mij deelden. Jullie bleven mij helpen ook al vroeg ik verschillende keren om herhaling. Door jullie gedrevenheid zijn mijn ervaringen en kennis aanzienlijk uitgebreid.

Ten slotte, maar zeker niet minder belangrijk, wil ik mijn ouders, mijn vriend en mijn ondersteuner, Sarah Van Hooreweder, bedanken voor de steun en de motivatie. Zij spoorden me aan om te blijven doorgaan ook al liep het soms niet van een leien dakje.

**Stappers Flore**  
11 juni 2019

## Titel

**Kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren**

## Omschrijving van de stageopdracht

Bij het stellen van een klinische diagnose is een goede beeldkwaliteit bij een scan essentieel. Preklinische in vivo imaging wordt vaak in de medische wereld gebruikt, zoals bij onderzoek naar kanker, hart- en vaatziekten, orthopedie ... INnovative Flemisch IN vivo Imaging Technology (INFINITY) Lab is één van de expertisecentra binnen de Universiteit van Gent. Het is ook een aanspreekpunt voor medische beeldvorming bij kleine proefdieren. Het Lab draagt ook bij aan geneeskundige onderzoeken. In de onderzoeken dient er met verschillende parameters rekening gehouden te worden. Door een correcte monitoring van de proefdieren zijn de bekomen resultaten betrouwbaar en bruikbaar. Naast het evalueren van de resultaten wordt er ook veel aandacht besteed aan het welzijn van de dieren. Beide thema's worden in dit stageverslag uitgebreid besproken.

## Trefwoorden

- Natuurlijk gedrag
- Medische beeldvorming
- Stress
- $^{18}\text{F}$ -FDG

## Inhoudsopgave

<b>Titel</b> .....	4
<b>Kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren</b> .....	4
<b>Omschrijving van de stageopdracht</b> .....	4
<b>Trefwoorden</b> .....	4
Inhoudsopgave.....	5
<b>Technische fiche stagebedrijf</b> .....	6
1      Voorstelling van het bedrijf: INFINITY Lab.....	7
1.1    Laboratorium .....	7
1.1.1    PET (Triumph-II van Trifoil Imaging).....	7
1.1.2    SPECT (Uspect-II van Milabs).....	7
1.1.3    CT (aanwezig op Triumph, Uspect en de SARRP) .....	8
1.1.4    MRI (PharmaScan van Bruker Biospin) .....	8
1.1.5    Ultrasound (VEVO 2100 van VisualSonics) .....	8
1.1.6    Radiotherapie (SARRP van Xstrahl).....	8
1.1.7    Optische beeldvorming (bioluminescentie en fluorescentie, IVIS Lumina II van PerkinElmer) .....	8
2      Kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren.....	9
2.1    Inleiding.....	9
2.1.1    Natuurlijk gedrag .....	9
2.1.2    Dierenwelzijn en stress .....	9
2.2    Aandachtspunten voor kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren 12	
2.2.1    Effecten van het type anesthesie.....	13
2.2.2    De effecten van de omgevingstemperatuur .....	14
2.2.3    De effecten van vasten.....	16
2.2.4    Effecten van de injectieroute .....	17
2.2.5    De effecten van de hoeveelheid radioactiviteit.....	19
2.2.6    Algemeen besluit.....	20
3      Voorstelling van de dagelijkse werkzaamheden .....	21
3.1    Week 1 .....	21
3.2    Week 2.....	26
3.3    Week 3.....	30
3.4    Week 4.....	36
3.5    Week 5.....	39
3.6    Week 6.....	41
4      Persoonlijke visie .....	44
4.1    Persoonlijke visie op het stagebedrijf .....	44
4.2    Persoonlijke visie op je stage en je functioneren. ....	46
Lijst met gebruikte afkortingen.....	47
Bronvermelding .....	48

## Technische fiche stagebedrijf

<b>Naam stagebedrijf:</b>	INFINITY Lab
<b>Adres:</b>	Corneel Heymanslaan 10 (ingang 21)
	9000      Gent
<b>Telefoonnummer:</b>	+32 93 320 054
<b>E-mail:</b>	<a href="mailto:infinity@Ugent.be">infinity@Ugent.be</a>
<b>Directeur/diensthoofd:</b>	Christian Vanhove
<b>Stagementor:</b>	Christian Vanhove
<b>Sector:</b>	Proefdierkunde
<b>Afdeling/Groep binnen het stagebedrijf:</b>	Medische beeldvorming
<b>Aantal werknemers:</b>	Vijf werknemers
<b>Specialisatie:</b>	Positron Emission Tomography (PET), Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), Computed Tomography (CT), Magnetic Resonance Imaging (MRI), Ultrasound (US), and optical imaging (bioluminescence and fluorescence imaging)
<b>Twee relevante publicaties van het stagebedrijf:</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Braeckman K, Descamps B, Pieters L, Vral A, Caeyenberghs K, Vanhove C. Dynamic changes in hippocampal diffusion and kurtosis metrics following experimental mTBI correlate with glial reactivity. NEUROIMAGE-CLINICAL. 2019;21.</li><li>2. De Meulenaere V, Neyt S, Vandeghinste B, Mollet P, De Wever O, Decrock E, et al. Species-dependent extracranial manifestations of a brain seeking breast cancer cell line. PLOS ONE. 2018;13(12).</li></ol>

# 1 Voorstelling van het bedrijf: INFINITY Lab

INFINITY Lab is een onderdeel van de onderzoeksgroep 'Medical Image and Signal Processing' (MEDISIP). MEDISIP maakt deel uit van het departement 'Elektronica en Informatie Systemen' (ELIS) van de Faculteit Ingenieurswetenschappen en het platform (FEA) aan de Universiteit Gent (Ugent). INFINITY is het onderzoeksinstituut voor preklinische beeldvorming en heeft de capaciteit om multimodaliteit-beeldvorming aan zowel nationale als internationale klanten/onderzoekers aan te bieden. Het is een organisatievorm voor twee grote onderzoeksgroepen, namelijk MEDISIP en het laboratorium voor Radiofarmacie (MEDISIP, z.j.). INFINITY Lab wordt door vier bekwame en ervaren wetenschappelijke professoren geleid: Christian Vanhove, Stefaan Vandenberghe, Filip De Vos en Roel van Hohen. Professor Christian Vanhove, mijn stagebegeleider, is voor de organisatie van het laboratorium verantwoordelijk. Daarnaast coördineert hij ook de partneronderzoeken. Deze partnerschappen kunnen binnen Ugent ontstaan, maar zijn ook met particuliere bedrijven of andere universiteiten mogelijk. De belangrijkste onderzoeksdomeinen binnen het INFINITY Lab zijn neuromodulatie (diepe hersenstimulatie en trans-craniale magnetische stimulatie), het gebruik van speurmiddelen voor een betere karakterisering van tumoren, stress van het endoplasmatisch reticulum (ER stress), calcificatie van de vaatwand en cardiovasculaire onderzoeken om zich in de vorming van een aneurysma te verdiepen. Als laatste, maar zeker niet onbelangrijk, besteedt men ook aandacht aan de ontwikkeling van 'theranostic'. Dit is een nieuw domein in de geneeskunde dat specifieke gerichte therapie op basis van specifieke, gerichte diagnostische testen combineert (MEDISIP, z.j.)

INFINITY Lab is op de campus van UZ Gent gelegen: Corneel Heymanslaan 10, 9000 Gent. De ondergrondse ingang 21 biedt toegang tot het laboratorium. Om toegang te krijgen, heb je twee badges nodig. Het laboratorium zelf is niet groot, maar bestaat wel uit zeven afzonderlijke ruimtes. In elke ruimte staat een toestel. Op die manier kan elke onderzoeker in alle rust en geconcentreerd aan zijn experiment werken. Zoals eerder aangehaald, gebeurt de dagelijkse werking onder het toezicht van professor Christian Vanhove. Ook doctor Benedicte Descamps is in het laboratorium onmisbaar. Samen zorgen ze voor een aangename sfeer en bieden ze extra hulp waar nodig. Dankzij deze begeleiding kunnen master- en doctoraatsstudenten hun weg in het labo vinden en hun experiment opzetten.

## 1.1 Laboratorium

### 1.1.1 PET (Triumph-II van Trifoil Imaging)

PET is een niet-invasieve beeldvormingstechniek met een hoge gevoeligheid en een accurate kwantificatie. Het geeft de mogelijkheid om fysiologische, biochemische en farmacologische processen in levende organismen te visualiseren aan de hand van radiotracers, ook wel radioactieve isotopen genoemd (Pauwelyn G., 2014; Vermeulen S., 2012).

### 1.1.2 SPECT (Uspect-II van Milabs)

Bij een SPECT wordt er steeds een radioactief gelabelde stof (tracer) ingespoten. De geselecteerde stof wordt in bepaalde organen vastgehouden of aan bepaalde receptoren verbonden. Hierdoor wordt er een beeld verkregen. PET en SPECT geven echter maar beperkte informatie over de structuur. Omwille van deze reden gebruiken ze in de medische wereld een combinatie van functionele en structurele beeldvorming zoals PET-CT, SPECT-CT ... (Pauwelyn G., 2014).

### **1.1.3 CT (aanwezig op Triumph, Uspect en de SARRP)**

Computertomografie is een medische beeldvormingstechniek die beelden van transaxiale vlakken maakt. Door een fijne bundel X-stralen doorheen het lichaam wordt er een beeld gevormd. De X-stralen worden aan de andere zijde door een fluorescerende plaat opgevangen (Pauwelyn G., 2014).

### **1.1.4 MRI (PharmaScan van Bruker Biospin)**

Magnetische Resonantie Imaging werkt onder invloed van een sterk extern magnetisch veld en radiopulsen. De waterstofprotonen in het lichaam sturen een elektromagnetisch signaal uit dat door een detector wordt opgevangen. MRI biedt een groter contrast tussen de verschillende zachte weefsels van het lichaam dan een CT-scan. MRI wordt vooral gebruikt bij neurologische en oncologische beeldvorming en beeldvorming van de spieren en het hart gebruikt (Muylaert A., 2017).

### **1.1.5 Ultrasound (VEVO 2100 van VisualSonics)**

Ultrasone golven geven informatie over de weefsels in het lichaam. De ultrasone golven worden weerkaatst op de grens tussen de akoestisch verschillende media. Op die manier ontstaan er echo's die opgevangen worden. Hieruit wordt er een beeld opgesteld. Echografie wordt in het laboratorium vaak gebruikt om heel gericht injecties te geven, zoals het injecteren van een orgaan (Muylaert A., 2017).

### **1.1.6 Radiotherapie (SARRP van Xstrahl)**

De SARRP stuurt gerichte ioniserende stralen naar pre-klinische diermodellen uit met een nauwkeurigheid die klinische radiotherapie nabootst. Enerzijds kan de gebruiker het dier, de tumor / het doelwit en organen die gevaar lopen, in beeld brengen. Daarnaast kan ook de dosis geëvalueerd en de gewenste behandeling uitgevoerd worden (Innovative Molecular, 2016).

### **1.1.7 Optische beeldvorming (bioluminescentie en fluorescentie, IVIS Lumina II van PerkinElmer)**

De IVIS Lumina II kan zowel fluorescente als bioluminescente reporters in levende laboratoriumdieren (ratten en muizen) afbeelden. Het systeem is met een maximum van 21 filtersets uitgerust die gebruikt kunnen worden om reporters af te beelden. De kleuren van de beelden kunnen verschillen van groen tot nabij-infrarood. Bijvoorbeeld: het injecteren van luciferine bij een muis geeft uitzending van licht onder invloed van luciferase-positieve cellen (Innovative Molecular, 2016).



## 2 Kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren

### 2.1 Inleiding

#### 2.1.1 Natuurlijk gedrag

##### 2.1.1.1 Muizen

Muizen zijn prooidieren en hun natuurlijk gedrag is hier in grote mate aan aangepast. Wanneer een muis een bedreiging waarneemt, vlucht en verschuilt het dier zich zo snel mogelijk in een beschutting. Dit is ook één van de redenen waarom de dieren in de buurt van een beschutting leven. Aangezien muizen nachtdieren zijn, zijn ze overdag meestal in de beschutting van hun nesten terug te vinden. Muizen zijn actieve, zeer exploratieve dieren en spenderen het meeste van hun tijd aan foerageren in het wild (Van Wiele P., 2018). In de natuur bouwen ze typisch koepelvormige nesten. Ruiken is één van hun sterkste zintuigen. Daarnaast communiceren deze sociale dieren ook via het uitzenden van geluid. Muizen hebben zeer gevoelige oren en zijn in staat geluiden, die voor ons niet hoorbaar zijn, waar te nemen, zoals ultrasone geluiden. Op de frequenties van 80 – 100 kHz communiceren ze met elkaar (Van Wiele P., 2018). Meestal is er ook een hiërarchie met één dominant mannelijk dier, waaronder enkele mannelijke en vrouwelijke dieren met hun nakomelingen. Omdat er tussen de mannelijke dieren agressie kan optreden, gebeurt de groepshuisvesting vaak in kleine groepen. Het is belangrijk om voor een correcte huisvesting in functie van het geslacht te kiezen en de geslachten dus te scheiden. Op die manier wordt het dierenwelzijn bevorderd (Hutchinson et al., 2005).

In de wetenschap worden verschillende muizensoorten gebruikt, zoals *Mus musculus*, *Mus domesticus* en *Peromyscus spp.* Gedragsspatronen zoals sociaal, graaf- en nestgedrag waren al sinds hun voorouders aanwezig en zijn bij de domesticatie van de huidige muizenstammen niet verloren gegaan. Toch moet men steeds rekening houden met de stamverschillen (Hutchinson et al., 2005).

##### 2.1.1.2 Ratten

Net zoals muizen zijn ratten prooidieren en is hun gedrag hieraan aangepast. Ook ratten zijn sociale dieren en rusten overdag graag uit in hun eigen gebouwde complexe hollen. Ze zijn ook nachtactief en vluchten wanneer ze een bedreiging waarnemen. De dieren communiceren vooral via auditieve signalen. Zoals bij de muizen gebeurt deze communicatie door middel van ultrasone geluiden (80kHz) (Van Wiele P., 2018). In tegenstelling tot de muizen zijn de ratten niet agressief wanneer twee dominante mannetjes bij elkaar leven. Laboratoriumratten stammen af van de *Rattus norvegicus*. Net als bij de muizen is veel van hun natuurlijk gedrag bewaard gebleven. Er bestaat echter één uitzondering. Wilde ratten vertonen op elke leeftijd van hun bestaan de drang om een nest te bouwen. Bij laboratoriumratten komt dit niet voor. In een situatie waarbij ze voor de eerste keer nestmateriaal krijgen, vertonen ze geen nestgedrag. Dit kan als verminderd welzijn beschouwd worden, maar is bij deze ratten niet ongewoon. Door het missen van een belangrijke fase, het sociaal leren, in hun eerste levensweken ontbreekt dit gedrag (Hutchinson et al., 2005).

#### 2.1.2 Dierenwelzijn en stress

Vandaag de dag wordt een groot aantal muizen en ratten voor dierproeven ingezet. De wetenschap beslist dat deze dieren hun leven in laboratoriumkooien zullen doorbrengen. Ondanks dat de dieren zich niet in de natuur verder kunnen ontwikkelen, wordt er heel wat

aandacht aan het dierenwelzijn gespendeerd. De onderzoekers proberen in alle mogelijke situaties de stress bij kleine proefdieren te vermijden of te beperken. Het is belangrijk dat de dieren zich fysiek en psychisch goed voelen, dit op vlak van dierenwelzijn, maar natuurlijk ook in het kader van het onderzoek. Stress heeft een invloed op de hormonale spiegels in het bloed. Het dier zal zich abnormaal gedragen en zal in sommige situaties ziek worden. Tijdens testmomenten kan dit voor vertekende resultaten zorgen. Dieren die zich in stresssituaties bevinden, reageren anders op experimentele handelingen. De resultaten zullen dan ook onbetrouwbaar zijn.

### **2.1.2.1 Wat is dierenwelzijn?**

Dierenwelzijn is een abstract begrip. Er bestaat geen eenduidige definitie en is dus praktisch heel moeilijk in te vullen. Toch is er sedert enkele jaren steeds meer aandacht voor het welzijn van dieren in laboratoria. Het omvat zowel de fysieke als de mentale gezondheid van het individu. Er wordt voorgelegd dat er gestreefd moet worden tot het beperken van het ongemak bij (proef)dieren. In 1965 trachtte het Brambell Committee als eerste een definitie te verwoorden. Dit leidde tot de vijf vrijheden (Farm Animal Welfare Council, 2011).

1. Dieren zijn vrij van honger en dorst. Ze hebben gemakkelijk toegang tot vers water en een adequaat rantsoen;
2. Dieren zijn vrij van ongemak. Ze hebben een geschikte leefomgeving inclusief onderdak en een comfortabele rustplaats;
3. Dieren zijn vrij van pijn, verwonding en ziekte. Er is sprake van preventie en een snelle diagnose en behandeling;
4. Dieren zijn vrij van angst en stress. Er is zorg voor voorwaarden en behandelingen die geestelijk lijden voorkomen;
5. Dieren zijn vrij om normaal gedrag te vertonen. Ze hebben voldoende ruimte, goede voorzieningen en gezelschap van soortgenoten.

Het fysisch en psychisch in harmonie leven met de omgeving is daarvan ook een onderdeel. Dieren hebben nood aan een leefomgeving die geschikt is voor hen, ongeacht ze in vrijheid of in kooien leven. Muizen dienen een bepaalde controle te hebben over hun huisvestingssysteem. In dit systeem hebben de dieren nood aan het kunnen uitvoeren van hun natuurlijke gedragingen (Jennings et al., 1998). Naast de soortverschillen kunnen er ook rasverschillen zijn die hun eigen specifieke behoeften hebben, waarmee we rekening dienen te houden (Coenen N., 2011).

Een tweede luik bestaat uit het psychologisch welzijn, wat heel wat moeilijker te beoordelen is. De mentale toestand van dieren evalueren is zeer complex (Hetts et al., 1992). Het is onmogelijk om de mentale toestand te kwantificeren. Om dit toch in beeld te brengen, wordt er gebruik gemaakt van gedragsmatige en fysiologische parameters, zoals vocalisatie en het meten van cortisol-levels (Mendl et al., 2009).

### **2.1.2.2 Het stressmechanisme**

Om het welzijn, de stress en de pijn bij dieren te evalueren, is het van uiterst belang om over de nodige kennis te beschikken. Stress is een natuurlijk fenomeen. Wanneer een dier zich bedreigd voelt, zal er een psychische en fysische reactie op de veranderingen, die het biologisch evenwicht verstoren, optreden (Van Wiele P., 2018). De psychische en fysische reactie gebeurt als het hypothalamus-hypofyse-adrenocorticaal systeem wordt geactiveerd. Door het vrijkomen van corticosteroïden en metaboliëten kan het dier zich aan de omgeving aanpassen. Door de reactie op de stressor wordt er een herstel van homeostase gecreëerd. Zolang een dier zich aan de omgeving kan aanpassen, zorgt de stress niet voor welzijnsproblemen (Mormède et al., 2007).

Indien de dieren toch stress ervaren, kan het gedrag dat ze vertonen om met de gewijzigde situatie om te gaan, geëvalueerd worden aan de hand van de activiteit van hun sympathisch zenuwstelsel, de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as en hun gedrag. Hierbij is het belangrijk dat deze parameters met behulp van de correcte technieken, waarbij er zo weinig mogelijk invasie of verstoring teweeggebracht wordt, worden geëvalueerd. De fysiologische reactie op stress wordt vooral door het sympathisch zenuwstelsel (SZ) geregeld. Een prikkeling van het SZ brengt een verhoging van de plasma-(nor)adrenalinespiegel, hartslag, bloeddruk en lichaamstemperatuur teweeg. Daarnaast veroorzaakt het ook veranderingen in de immunologische functies. Psychische stressoren worden meer met een toename van adrenaline, afkomstig uit het bijniermerg, geassocieerd terwijl noradrenaline uit het SZ met een fysieke activatie wordt gerelateerd (Coenen N., 2011). Radiotelemetrie is een niet-invasieve methode om de fysiologische parameters, zoals hartslag en bloeddruk, te kwantificeren. Deze techniek maakt het mogelijk om door middel van radiogeluidsgolven de hartslag en bloeddruk te meten. De dieren hoeven niet opgenomen worden, maar kunnen vrij blijven rondlopen. De resultaten zijn betrouwbaar en hartslag en bloeddruk liggen lager dan alternatieve invasieve methoden (Kramer et al., 2001).

Hormonale reacties op stressoren worden grotendeels door het hypothalamus-hypofysesysteem beïnvloed. Zoals eerder aangehaald speelt het hypothalamus-hypofyse-bijnierschorsysteem hierin een belangrijke rol. De hoeveelheid bijnieractiviteit is een duidelijke parameter om stress of angst te meten. Het geeft namelijk een verhoogde activiteit in periode van stress en angst weer. Corticosteroiden en metabolieten worden via de urine en feces uitgescheiden en worden gebruikt in de beoordeling van stresssituaties. De resultaten zijn betrouwbaarder in vergelijking met de serumstalen. Door de invasieve methode geven die altijd een verhoogd gehalte van corticosteroiden weer. Metabolieten worden 20% via de urine uitgescheiden en 80% via de feces (Bamberg et al., 2001). De grootste wijzigingen in de concentratie van corticosteroiden in urine worden bij mannelijke ratten na 1,7 uur waargenomen, bij de vrouwtjes is dit pas na zes uur. Het gehalte in de feces is bij beide geslachten hetzelfde. De grootste wijzigingen worden wel pas na 14,7 uur opgemerkt. De hypofyse-bijnierschors respons is afhankelijk van de mate waarin de stressor beïnvloedbaar of voorspelbaar is. Langdurige verhoogde waarden, afwijkend van de normaalwaarden, van catecholamines en corticosteroiden in het plasma is een indicatie voor een verstoord welzijn. Chronische stress, ook wel pathologische stress genoemd, zorgt voor het ontstaan van allerlei ziekten en dysfuncties, zoals bijnierhypertrofie, thymusinvolutie en maagzweren. Ten gevolge van een immunosuppressieve werking van langdurig verhoogde cortisolspiegels kan er een verhoogde vatbaarheid voor infecties ontstaan (Coenen N., 2011). Chronische stress kan aan de hand van het secretorische immunoglobuline A in de feces worden ingeschat (Pihl en Hau, 2003). Een voordeel van het gebruik van feces is het makkelijk afnemen en het toelaten van langdurig onderzoek.

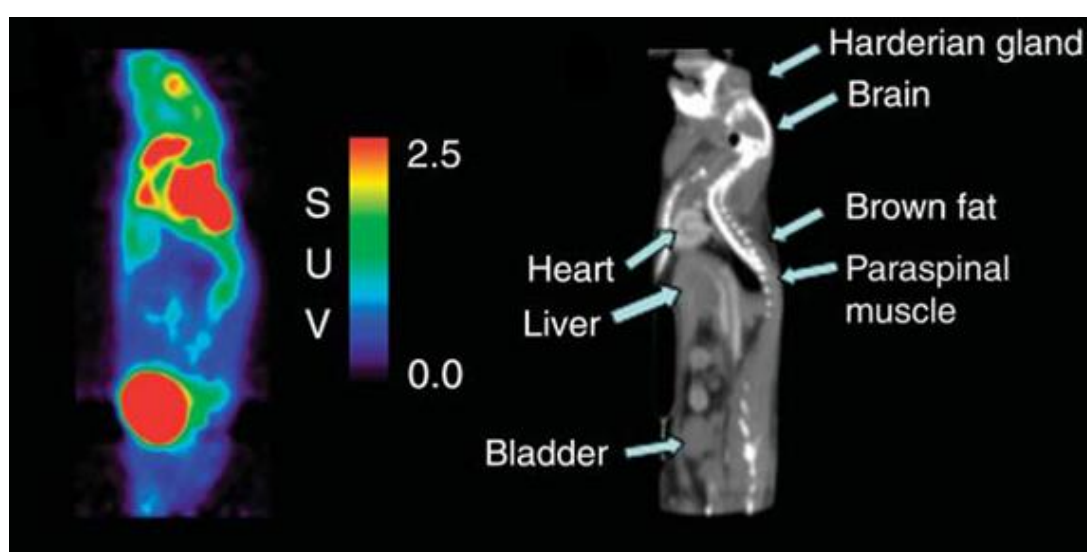
Naast chronische stress komt er ook acute stress voor. Dit is een stoornis die onmiddellijk na de blootstelling aan een ernstig trauma kan optreden. In het detecteren van acute stress bij muizen en ratten worden de Harderse klieren onderzocht. Die produceren porfyrones en rode secretie rond de ogen en neus. Bij ratten/muizen die zich gestrest of onwel voelen, kan er rond de ogen en of de neus een rode verkleuring zichtbaar zijn. Het lijkt dan alsof de ogen of de neus bloedt. Aan de hand van andere fysiologische parameters, zoals verminderde voedselopname, gewichtsverlies, diarree, dehydratatie ... kan het welzijn van het dier ook worden beoordeeld. Ook gedragsparameters, die dagelijks geobserveerd worden, kunnen een beeld geven. Hierbij dient er wel rekening gehouden te worden met de mogelijke fysiologische verschillen tussen soorten en of stammen (Van Wiele P., 2018).

Wanneer gedragsparameters in functie van welzijn geëvalueerd worden, kunnen de volgende zaken van groot belang zijn bij het observeren van de dieren. Gedragingen zoals: sociale isolatie, stereotypieën, veel slapen, houding, angst, agressie, kannibalisme, vocalisaties, vermindering in 'grooming', apathie, automutilatie en verandering in activiteit.

Wanneer de bovenstaande gedragingen waar te nemen zijn, kan dit betekenen dat het dier niet in staat is om zich aan zijn huidige huisvesting aan te passen. Stereotypieën die frequent voorkomen, zijn traliebijten, springen, het maken van salto's, ijsberen en 'barbering'. In het laatste geval plukt het individu haar bij zichzelf of bij soortgenoten en doet dit in een bepaald patroon (Van Wiele P., 2018).

## 2.2 Aandachtspunten voor kwaliteitsvolle medische beeldvorming bij kleine proefdieren

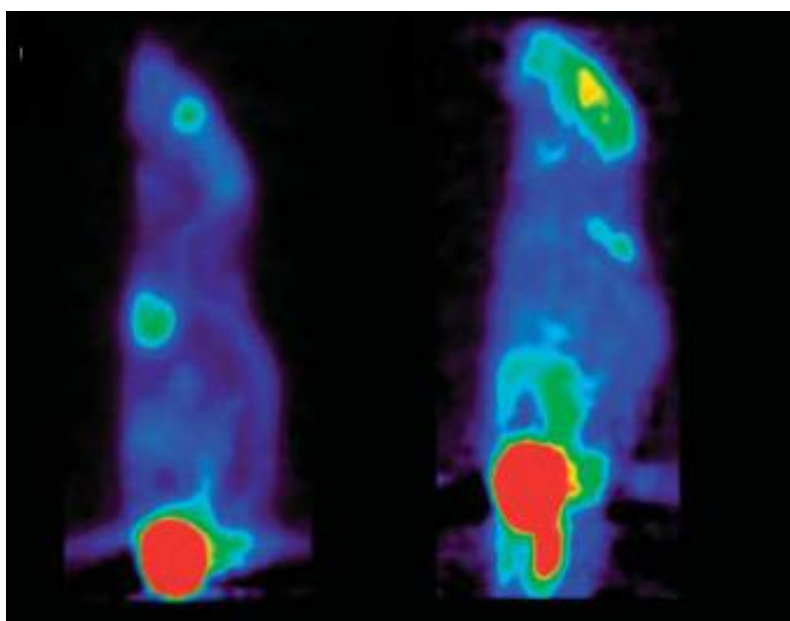
Medische beeldvorming, zoals CT, MRI, PET en SPECT, wordt in een ziekenhuis veel gebruikt, zoals bij onderzoek naar kanker, hart- en vaatziekten, orthopedie, immunologie, en neurologische aandoeningen. Om een nauwkeurige en correcte klinische diagnose te kunnen stellen, is het van essentieel belang om een goede beeldkwaliteit van PET-, SPECT-, MRI-beelden ... te hebben. In de proefdierenwereld wordt er ook gebruik gemaakt van medische beeldvorming om beter te begrijpen wat er gebeurt bij bepaalde ziekteprocessen en om nieuwe behandelingen te onderzoeken. INFINITY Lab is één van de expertisecentra binnen de Universiteit Gent en is een centraal aanspreekpunt voor medische beeldvorming bij kleine proefdieren. INFINITY Lab draagt bij aan het zoeken naar antwoorden in verschillende geneeskundige onderzoeken. Net zoals bij een patiënt is het bij medische beeldvorming van kleine proefdieren zeer belangrijk om de verschillende parameters tijdens de proeven goed op te volgen, zoals injectieroute, hoeveelheid radioactiviteit, vasten, maar ook lichaamstemperatuur en anesthesie. Een correcte monitoring van kleine proefdieren zorgt ervoor dat de bekomen resultaten betrouwbaar, bruikbaar en reproduceerbaar zijn. Door het evalueren van de beste praktische handelingen voor preklinische beeldvorming wordt zowel de beeldkwaliteit als het welzijn van de muizen en ratten geoptimaliseerd. Anderzijds is een goed welzijn van de dieren ook zeer belangrijk omdat het de beeldkwaliteit kan beïnvloeden. Figuur 1 illustreert hoe het negeren van enkele 'best practices' ervoor kan zorgen dat beelden negatief beïnvloed worden. Het is een voorbeeld van PET/CT beeldvorming waar weinig voorbereidingen werden getroffen, alvorens het dier te scannen. De muis kon blijven eten en werd niet verwarmd tijdens de anesthesie. Anesthesie werd enkel gebruikt om de speurstof, die noodzakelijk is voor PET-beeldvorming, te injecteren. De speurstof die hier gebruikt werd is  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG), of radioactief gelabeld suiker. De linkse muis op Figuur 2 is een voorbeeld van een kwaliteitsvolle beeldvorming dat gebruikt kan worden om een correcte diagnose te stellen.



Figuur 1: PET-scan van een muis (links): verwijzing naar condities die niet werden gemonitord: niet gevast, onverwarmd, geen anesthesie. CT-scan van een muis (rechts): sagittale doorsnede om anatomische correlatie weer te geven. Gedeeltelijk overgenomen van (Fueger et al. 2006).

## 2.2.1 Effecten van het type anesthesie

Om dierproeven met medische beeldvorming op een veilige en verantwoordelijke manier uit te voeren, wordt er steeds voor anesthesie of sedatie gekozen. Het is echter in verschillende onderzoeken bewezen dat diverse verdovingsmiddelen enerzijds een invloed hebben op de biodistributie van  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) in het lichaam. Anderzijds speelt het een rol in het glucosegebruik door verschillende weefsels. In een studie van Lee et al. (2005) werd het effect van ketamine/xylazine en pentobarbital op  $^{18}\text{F}$ -FDG biodistributie bestudeerd. Twee andere studies breidden dat onderzoek uit waarin isofluraan als anesthesiemiddel werd gebruikt. Zowel isofluraan als xylazine worden gebruikt om insulineafscheiding te onderdrukken. Uit het onderzoek van Fueger et al. (2006) bleken de effecten van xylazine ten opzichte van isofluraan sterk uitgesproken te zijn. Ook al werd er acht uur gevast, toch veroorzaakte xylazine een hyperglycemie. Om een xylazine-geïnduceerde hyperglycemie te onderdrukken, dienden de muizen twintig uur te vasten. Voor het welzijn van de dieren is dit niet realiseerbaar. Langdurig vasten leidt tot gewichtsverlies en is niet haalbaar wanneer muizen herhaaldelijk voor medische beeldvorming worden gebruikt. Daarnaast wordt er bij een anesthesie, geïnduceerd door isofluraan, een milde stijging van bloedglucose vastgesteld, zowel bij proefdieren die vastten als bij de dieren die niet vastten. De keuze van het verdovingsproduct kan de beelden – en dus ook de resultaten beïnvloeden, wat geïllustreerd wordt in Figuur 2 (Fueger et al. 2006).



*Figuur 2: Effect van anesthesiemiddel op PET scan. Links: gevast, verwarmd en geanestheseerd met isofluraan. Rechts: gevast, verwarmd en geanestheseerd met ketamine/xylazine. Gedeeltelijk overgenomen van (Fueger et al. 2006).*

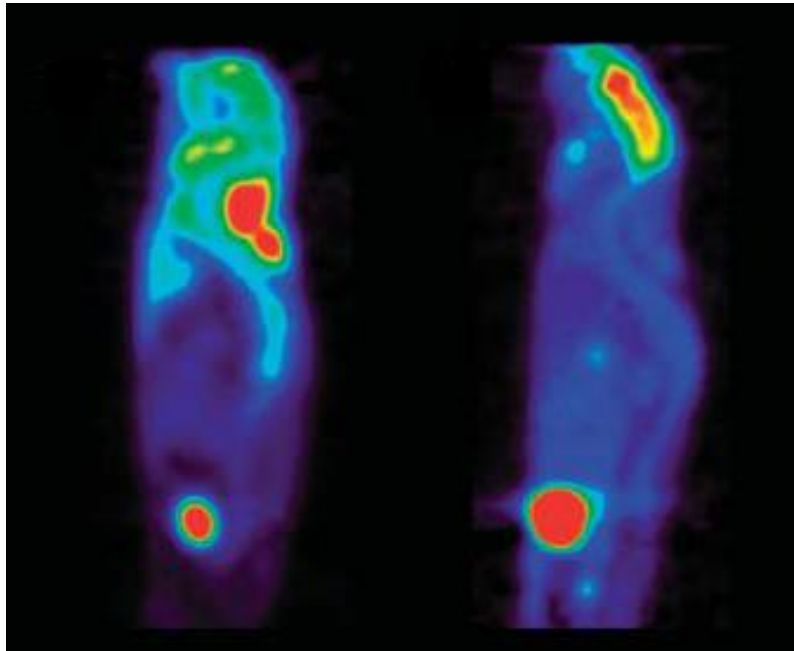
Anesthesiemiddelen hebben eveneens invloed op het glucosegebruik door verschillende weefsels. In bruin vetweefsel, gekend als één van de meest geïnnerveerde weefsels door het sympathisch zenuwstelsel, wordt de metabole activiteit wordt  $\beta$ 3- en  $\alpha$ 2-receptoren gereguleerd. De activatie van  $\beta$ 3-receptoren stimuleert de doorbloeding en de metabole activiteit van bruin vetweefsel. In tegenstelling tot de  $\beta$ 3-receptoren oefenen de  $\alpha$ 2-receptoren een omgekeerd effect uit. Noradrenaline bindt zich op beide soorten receptoren, maar het effect op de  $\beta$ 3-receptoren is dominerend. Daarnaast stimuleert noradrenaline ook de metabole activiteit (Fueger et al. 2006). Het anesthesiemiddel ketamine verhoogt het noradrenalinegehalte in het plasma met als gevolg dat de metabole activiteit gestimuleerd wordt. Ter hoogte van het bruin vetweefsel wordt er een toegenomen  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname

vastgesteld. Tijdens het onderzoek waarbij ketamine met xylazine, die de  $\alpha_2$ -receptoren activeren, geassocieerd wordt, is er een opmerkelijke daling in de opname van  $^{18}\text{F}$ -FDG in het bruin vetweefsel vast te stellen. Anesthesie door middel van isofluraan vertoont eveneens een verminderde  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname, in overeenstemming met zijn remmend effect op de thermogenese door het bruin vetweefsel (Fueger et al. 2006).

Anesthesie betekent 'gevoelloosheid' (analgesie) en 'diepe slaap'. Het gebruik van analgesie is wettelijk verplicht en kadert in de toepassing van de 3R'en, meer bepaald 'Refinement'. Door het gebruik ervan ervaren de dieren geen onnodig lijden. Binnen het INFINITY Lab is het van uiterst belang om betrouwbare en reproduceerbare resultaten te bekomen. De algemene anesthesie in het lab gebeurt voornamelijk door middel van gasanesthesie. Het verdovingsmiddel wordt via inhalatie door het lichaam opgenomen. Het systeem bestaat uit een open inductiebox waar muizen en ratten aan het begin van het experiment in verdoofd worden. Wanneer er een rustige ademhaling waar te nemen is, wordt het dier overgeplaatst en in slaap gehouden door een masker (ratten) of anesthesiebuisje (muizen). Het open systeem heeft een na- en voordeel. Enerzijds gaat er in een dergelijk systeem heel wat anestheticum in de omgeving verloren. Anderzijds ontwaken de dieren snel en kennen ze een vlottere recovery. In uitzonderlijke situaties wordt er van anesthesie d.m.v. een injectie gebruik gemaakt. Hierbij is het zeer belangrijk dat de dosis specifiek aan de stamlijn, leeftijd en geslacht aangepast wordt. De meeste dieren, vooral muizen, zijn hier enorm gevoelig voor en kunnen hieraan overlijden. In het kader van het onderzoek betekent dit dat er onnodig verlies van een dier is en leidt dit tot een beperkter aantal testresultaten (Van Wiele P., 2018).

## 2.2.2 De effecten van de omgevingstemperatuur

Zoals hierboven aangehaald, is het noodzakelijk om de dieren tijdens de dierproeven geanestheseerd te houden. Op die manier ondergaan ze de proeven onbewust. Tijdens het anestheseren is het belangrijk om de klinische toestand van het proefdier verder op te volgen. De controle van de lichaamstemperatuur is hierbij van uiterst belang. Bij muizen en ratten kan hun temperatuur, door contact met koude vloeistoffen of tafel, snel dalen. Ook bloedverlies of geschoren lichaamsdelen kunnen tot een daling in de lichaamstemperatuur leiden. Om de ernst van hypothermie te onderdrukken, wordt er gebruik gemaakt van een verwarmde plaat of een warmwaterbed. Uit studies van Fueger et al. (2006) met een PET-scan blijkt dat de omgevingstemperatuur en het vasten een effect hebben op de  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose opname ( $^{18}\text{F}$ -FDG) door het bruin vetweefsel en de spieren. Wanneer muizen in hun thermo-neutrale zone, 30-34°C, gehouden worden, zijn er tijdens de voorbereidingen van de PET-scan geen lichaamsprocessen nodig om hun lichaamstemperatuur op peil te houden. In tegenstelling tot muizen die niet verwarmd werden tijdens voorbereidingen van de PET-scan, worden er grote activiteiten ter hoogte van het bruin vetweefsel en de spieren waargenomen. Door een verhoogde activiteit, om warmte te genereren, is er een verhoogde  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname vast te stellen in het bruin vetweefsel en de spieren (zie Figuur 3). Daardoor worden in de PET-scan organen of weefsels afgebeeld die niet van belang zijn, waardoor het moeilijker wordt om bijvoorbeeld een tumor of hersenactiviteit op te sporen.



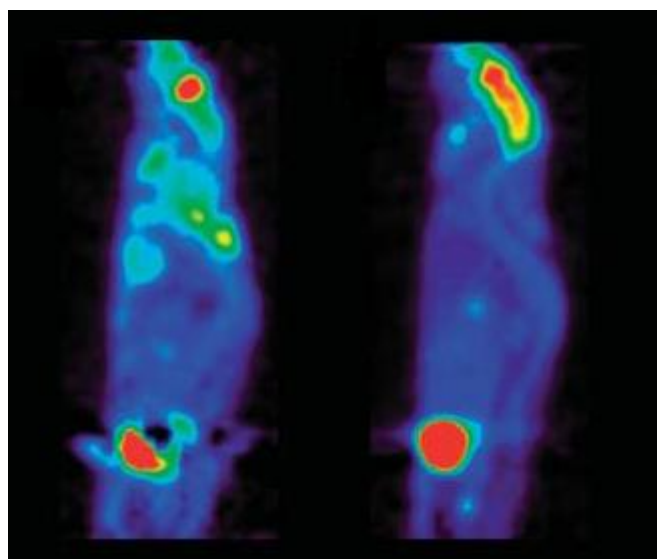
*Figuur 3: PET-scan van muizen in functie van verschillende parameters. Links: gevast, niet verwarmd en geen anesthesie tijdens de opname van FDG. Rechts: gevast, verwarmd en geen anesthesie tijdens de opname van FDG. Gedeeltelijk overgenomen van (Fueger et al. 2006).*

INFINITY Lab staat bekend voor preklinische beeldvorming die nadien in de humane geneeskunde kan toegepast worden. Hierbij is het van uiterst belang om de aandacht op de verschillende parameters te vestigen, waaronder de lichaamstemperatuur van het proefdier. Op de meeste toestellen is er bedverwarming op basis van elektrische weerstand voorzien. De MRI-scan is hierop een uitzondering. MRI werkt immers onder invloed van een sterk magnetisch veld en radiopulsen. Hierdoor is het niet mogelijk om een verwarmplaat of -bed op basis van een elektrische weerstand te gebruiken om de dieren te verwarmen. Hiervoor vond men een oplossing: het warmwaterbed. Het bed is aangesloten op een waterbad waar het water tot de gewenste temperatuur wordt opgewarmd. In een onderzoek naar de ontwikkeling van een doeltreffende tracer om tumoren aan de hand van een PET-scan op te sporen, wordt de muis met een infraroodlamp warm gehouden, voor, tijdens en na het onderzoek. Dit met het gewenste resultaat als gevolg: het bruin vetweefsel en spieren vertonen geen verhoogde activiteit.



### 2.2.3 De effecten van vasten

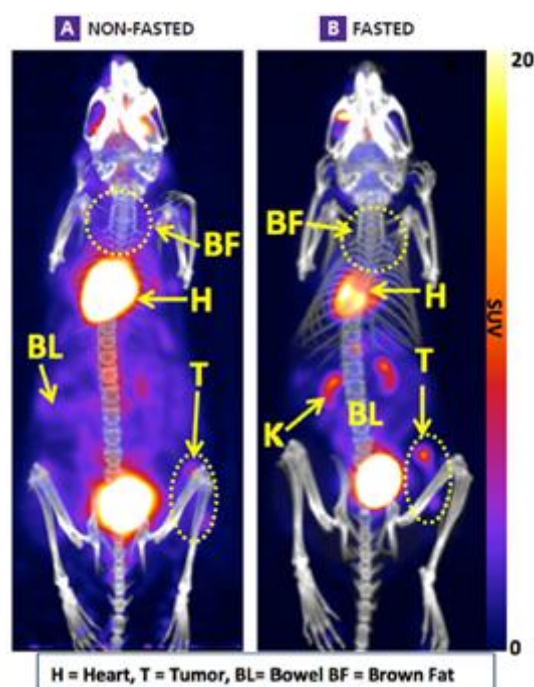
In het onderzoek van omgevingstemperatuur bij scans werd aangehaald dat het niet-vasten van proefdieren ook een grote invloed had op het bruin vetweefsel en de spieren (Fueger et al., 2006). Uit het onderzoek van Fueger et al. (2006) bleek dat  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname in de spieren en door bruin vet verminderd werd als de dieren tijdens de nacht hadden gevast (zie Figuur 4). Ook in een andere studie van Himms-Hagen J. (1984) werd aangetoond dat voeding een effect heeft op de metabole activiteit in bruin vet bij knaagdieren. De verhoogde activiteit zorgde ervoor dat het lichaamsgewicht op peil bleef door de overtollige calorierijke inname van voeding tijdens de nacht om te zetten in warmte. Wanneer er 's nachts gevast wordt, zal de doorbloeding en de warmteproductie door het bruin vetweefsel dalen. Het effect van vasten en verwarmen leidt tot meer dan een drievoudige verhoging van  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname door de tumor. Dit resultaat kan verklaard worden door de combinatie van een lager glucosegehalte in het plasma en een verminderde  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname door de overige weefsels/organen. In figuur 4 is er een verhoogde  $^{18}\text{F}$ -FDG opname ter hoogte van de spieren en bruin vet en een verlaagde opname in de hersenen bij de linkse muis waar te nemen. De opname in spieren en bruin vet reduceert sterk wanneer het dier gevast heeft (muis rechts). Verder is er ook een betere opname ter hoogte van de hersenen te zien. Dit leidt dus tot een betere beeldkwaliteit. Bovendien zorgt vasten voor een overschakeling naar het vet- en eiwitmetabolisme als middel om energie te produceren. Daardoor is het ideaal om de normale weefselachtergrond te minimaliseren (figuur 5) bij het visualiseren van glycolytische tumorcellen. Bij gevaste dieren is er een versterkt signaal waar te nemen ter hoogte van de nieren. De oorzaak hierin is de actieve verwijdering van de overtollige  $^{18}\text{F}$ -FDG tracer uit de bloedbaan (Fueger et al., 2006).



*Figuur 4: Effect van vasten op de beeldkwaliteit. Links: niet gevast, verwarmd en geen anesthesie tijdens de opname van FDG. Rechts: gevast, verwarmd en geen anesthesie tijdens de opname van FDG. Gedeeltelijk overgenomen van (Fueger et al. 2006).*

Proefdieren die in het INFINITY Lab gebruikt worden in functie van tumoren- en inflammatie-onderzoeken met behulp van de PET-scan worden voorafgaand gevast. In de vooravond/avond worden de voeding en pellets weggehaald om het dier gedurende de nacht te laten vasten. Enkel water wordt ter beschikking gesteld. Op die manier wordt de opname van  $^{18}\text{F}$ -FDG in het hart, het bruin vet en de spieren verlaagd, met als gevolg dat het algemeen beeldcontrast door een verminderde achtergrond van een  $^{18}\text{F}$ -FDG-opname in een normaal weefsel verbetert (Figuur 5).

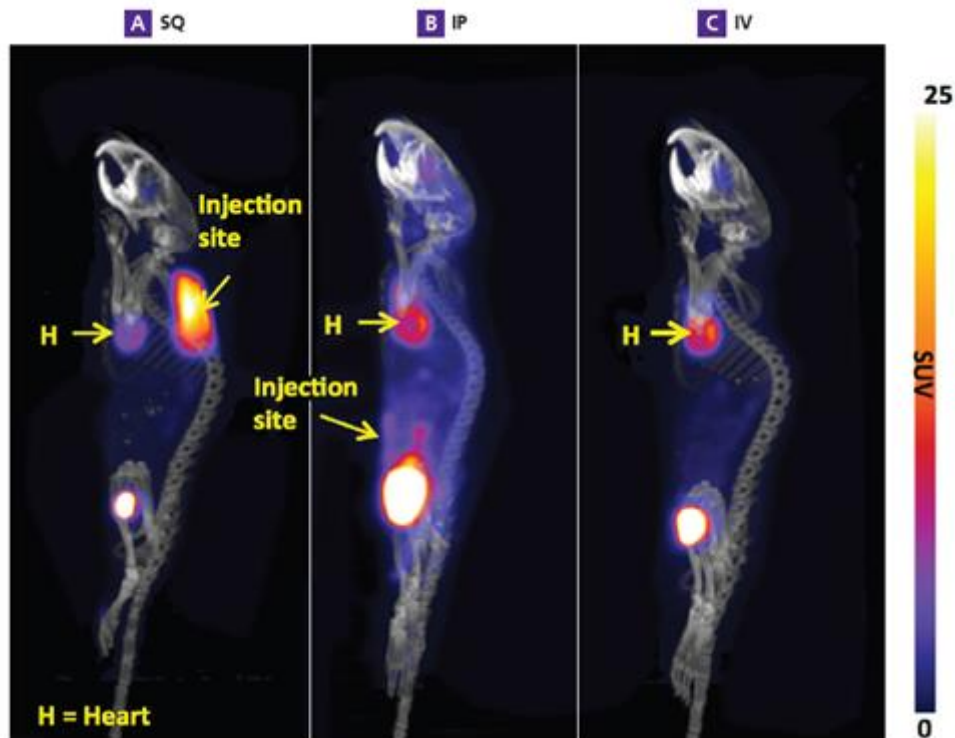




Figuur 5: PET-CT-beelden van twee muizen voor vergelijking van het effect van vasten; de muis links heeft niet gevast, de muis rechts heeft 8-12 uur gevast (Tseng et al., 2017).

## 2.2.4 Effecten van de injectieroute

De biodistributie en farmacokinetiek van de speurstof kunnen door de injectieroute sterk worden beïnvloed. Afhankelijk van de injectieplaats en –route kan het geïnjecteerde speurmiddel met de geïnteresseerde regio's interfereren, namelijk de tumor. Tseng et al. (2017) voerde een studie naar de effecten van de injectieroute uit. Acht weken oude vrouwelijke muizen werden drie keer geïnjecteerd, telkens op een andere manier, namelijk subcutaan, intraperitoneaal of intraveneus met respectievelijk 68, 24 en 50 $\mu$ Ci van  $^{18}$ F-FDG (Figuur 6). Het welzijn van de dieren kwam niet in gedrang. De studie werd onder isofluraan anesthesie uitgevoerd en de dieren werden warm gehouden door een verwarmd element. Een subcutane injectie, onder de huid, veroorzaakt enerzijds een trage biodistributie van de speurstof. Anderzijds is er een verhoogd signaal van  $^{18}$ F-FDG ter hoogte van de injectieplaats waar te nemen. Dit fenomeen wordt ook wel 'retentie' genoemd. Een intraperitoneale injectie vertoont een lichte visualisatie van het speurmiddel ter hoogte van de injectieplaats. In het verzamelen van kwaliteitsvolle medische beeldvorming is het belangrijk om vals-positieve resultaten zoveel mogelijk te vermijden. Dit betekent dat de interferentie tussen het ongewenste speurmiddelretentie en het gewenste target, de tumor, zo min mogelijk moet blijven. De beste kwaliteit van, bijvoorbeeld, een PET-scan wordt met een intraveneuze injectie van het speurmiddel bekomen. De bloedsomloop laat een snelle biodistributie zonder artefacten, veroorzaakt door de injectie, toe. Hoewel een intraperitoneale injectie ook haalbaar is, is het succes afhankelijk van waar de tumor zich bevindt. Ligt de tumor in het abdomen dan zal de visualisatie van de tumor van lagere kwaliteit zijn. In een situatie waar de tumor zich in de hersenen bevindt, zal dit heel wat duidelijker zijn. Doordat er geen interferentie met de artefacten ter hoogte van het abdomen optreedt, zullen de beelden kwaliteitsvoller zijn. Subcutane injecties worden vandaag de dag niet aanbevolen. De opname en biodistributie gebeuren te traag en veroorzaken eveneens een sterke retentie ter hoogte van de injectieplaats.

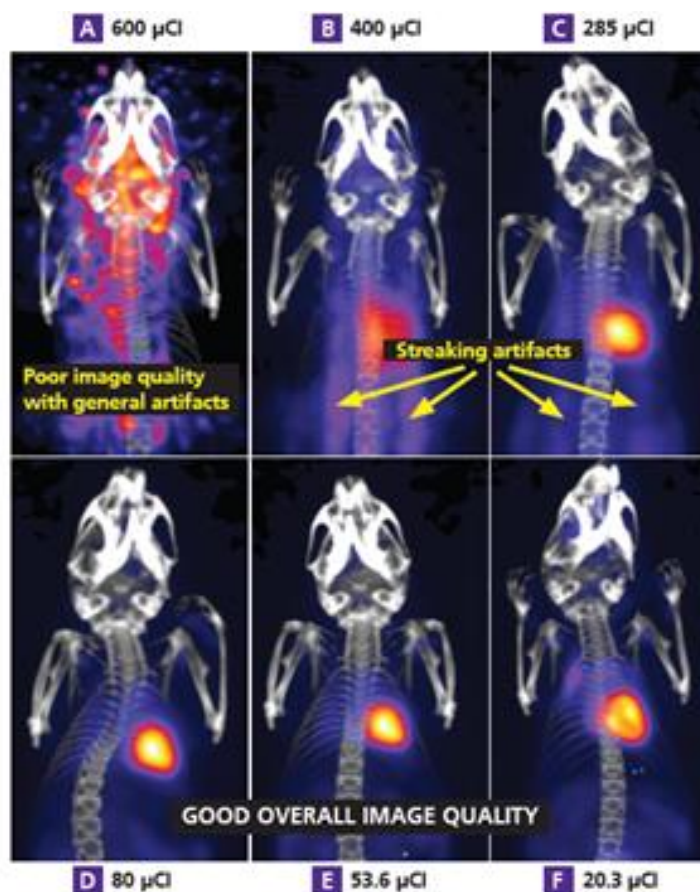


Figuur 6: Effect van de toedieningsroute en -plaats op de beeldkwaliteit van een PET scan. Muis A werd subcutaan geïnjecteerd, muis B intraperitoneaal en muis C intraveneus (Tseng et al., 2017).

Zoals reeds aangehaald staat het INFINITY Lab gekend voor preklinische beeldvorming die ook in de humane geneeskunde kan toegepast worden. Muizen en ratten worden, in het belang van het onderzoek, in de laterale staartvene geïnjecteerd. Dit resulteert in een kwaliteitsvolle beeldvorming. Subcutane injecties veroorzaken een trage biodistributie van het speurmiddel. Daardoor gebeurt de opname in de tumoren ook zeer traag. Om het welzijn van de proefdieren niet in het gedrang te brengen, wordt er snel, maar correct gewerkt. Omwille van negatieve gevolgen voor het dier wordt langdurige anesthesie zoveel mogelijk vermeden. Intraperitoneale injecties worden vaak foutief uitgevoerd. In dergelijke situaties is de kans groot dat bepaalde organen in de buikholte doorprikt worden. Dit leidt tot verstoorde resultaten. Na het afwegen van alle voor- en nadelen, komt intraveneus injecteren in de laterale staartvene als meest efficiënte en veilige injectieroute naar voor, dit in het belang van het dierenwelzijn en de onderzoeksresultaten.

## 2.2.5 De effecten van de hoeveelheid radioactiviteit

De gevoeligheid van een PET-scanner (het aantal fotonen dat per seconde gedetecteerd kan worden) heeft ook een grote invloed op de medische beeldvorming omdat het de hoeveelheid radioactiviteit bepaalt die geïnjecteerd dient te worden om een beeld te verkrijgen van voldoende kwaliteit. In het onderzoek van Tseng et al. (2017) werd er gebruik gemaakt van een G8 PET/CT-scanner van PerkinElmer. Deze PET-scanner had op dat moment de hoogste gevoeligheid. Op die manier konden onderzoekers proefdieren een lagere dosis radioactiviteit injecteren. Dit voordeel betekent dat het dier minder blootgesteld wordt aan hoge dosissen die het onderzoek *in vivo* zouden kunnen verstoren. Door de unieke capaciteiten van het G8-systeem laat dit toestel toe om ongeveer slechts een tiende van de dosis te injecteren (dus 90% minder) in vergelijking met andere PET-scanners. Een voorbeeldsituatie: door gebruik te maken van een 8G PET-scanner kan er met een radioactiviteit van  $2\mu\text{Ci}$  tot  $100\mu\text{Ci}$  al een beeld met voldoende kwaliteit gevormd worden. Door de hoge gevoeligheid van dit PET-systeem is een bereik van  $20\text{-}50\mu\text{Ci}$  wenselijk als hoeveelheid ingespoten radioactiviteit, in tegenstelling tot een minder gevoelige PET-scanner, die een hoeveelheid radioactiviteit vereist van  $200\text{-}500\mu\text{Ci}$  om een goede beeldkwaliteit te bekomen. Een lagere dosis geïnjecteerde radioactiviteit biedt niet enkel een voordeel voor de dieren, maar ook voor de onderzoekers en het milieu. Een lagere hoeveelheid radioactiviteit betekent een lager blootstellingspercentage, lagere aankoop- en verwijderingskosten (Tseng et al., 2017).



Figuur 7: PET beelden met een verschillende hoeveelheid radioactiviteit in het dier (Tseng et al., 2017).

Tseng et al. (2017) gebruikte in zijn studie een C57/BL6 vrouwelijke muis die acht weken oud was. De muis werd met een hoge dosis van 800 $\mu$ Ci  $^{18}$ F-FDG geïnjecteerd. Er werden zes PET-scans uitgevoerd op verschillende tijdstippen na het injecteren van de  $^{18}$ F-FDG speurstof. Door het radioactief verval zal de radioactiviteit in het dier in functie van de tijd dalen. Omwille van de anesthesie met isofluraan en door gebruik te maken van een warmtematje kwam het welzijn van de muis tijdens deze PET-scans niet in gedrang. In Figuur 7 worden een reeks PET-beelden getoond die 1-6 uur na de injectie met  $^{18}$ F-FDG werden opgenomen. Uit de resultaten bleek dat de beeldkwaliteit zeer goed was bij activiteiten die lager waren dan 100 $\mu$ Ci (Tseng et al., 2017).

INFINITY Lab streeft zowel nu als in de toekomst naar het beperken van de hoeveelheid radioactiviteit. In het lab zal in de nabije toekomst gebruik gemaakt worden van een nieuw type PET-scanner, de zogenaamde  $\beta$ -Cube van de firma Molecubes. Dit is momenteel de PET-scan met de hoogste gevoeligheid in het scannen van muizen en ratten. Door middel van deze nieuwe apparatuur kan de hoeveelheid radioactiviteit, die bij muizen en ratten toegediend worden, met een factor van tien verlaagd worden. Deze positieve evolutie is voor zowel de onderzoeker als voor het dier van groot belang. Op die manier daalt de stralingsbelasting.

## 2.2.6 Algemeen besluit

Medische beeldvorming is zoveel meer dan een dier verdoven en scannen. Om een kwaliteitsvolle medische beeldvorming te bekomen, dient men met verschillende aandachtspunten rekening te houden. Voorafgaand aan het onderzoek dient men na te denken over welke parameters een invloed kunnen hebben op de beeldkwaliteit. In de studies van Tsjeng et al. (2017) en Fueger et al. (2006) werd er vastgesteld dat muizen nuchter en verwarmd moeten zijn om een  $^{18}$ F-FDG PET-scan te ondergaan. Dit vermindert de  $^{18}$ F-FDG opname door het bruin vetweefsel en de spieren aanzienlijk. Op die manier is er geen interferentie met de beeldvorming van de tumor mogelijk. Daarnaast dienen de kleine proefdieren ook met isofluraan geanestheseerd te worden bij een toediening van  $^{18}$ F-FDG die intraveneus geïnjecteerd wordt. Op die manier wordt de verdere opname van  $^{18}$ F-FDG door de spieren beperkt. Via de laterale staartvene wordt een snelle biodistributie van  $^{18}$ F-FDG verzekerd en is er weinig tot geen retentie ter hoogte van de injectieplaats. Het gebruik van ketamine/xylazine bij de anesthesie mag, maar moet met enige voorzichtigheid gebruikt worden en rekening houden dat dit hyperglycemie kan veroorzaken. In de standaardisering van dierproeven, met betrekking tot de dierlijke handelingen zoals anesthesie, is het van essentieel belang om ervoor te zorgen dat er reproduceerbare en vergelijkbare gegevens verkregen worden (Tseng et al., 2017; Fueger et al., 2006). Er kan een bondig algemeen besluit van de aandachtspunten geformuleerd worden, waarmee men rekening dient te houden om kwaliteitsvolle medische beeldvorming te bekomen:

1. Gedurende een korte periode anesthesie gebruiken voor het toedienen van een speurstof.
2. Het dier warm houden tijdens het toedienen van een speurstof en gedurende de periode tussen het toedienen van de speurstof en de start van de medische beeldvorming.
3. Het dier laten vasten tijdens de periode net voor de medische beeldvorming
4. De effecten van de injectieroute goed afwegen.
5. Dosis radioactiviteit zo laag mogelijk trachten te houden.

## 3 Voorstelling van de dagelijkse werkzaamheden

### 3.1 Week 1

03/04/2019

- Rondleiding in het laboratorium waarin de werking van de verschillende toestellen voor de medische beeldvorming van kleine proefdieren opnieuw kort werd uitgelegd (zie kennismakingsverslag)
- Lezing (doctoral school) door Professor Christian Vanhove: in-vivo Imaging Techniques
- Testen van een nieuw type PET-scan aan de hand van een “muizenhotel”. Dit is een nieuw type van bed waardoor het mogelijk is om vier muizen in één keer te scannen.
  - Hierbij werden verschillende dosissen radioactief suiker intraveneus geïnjecteerd
  - De muizen werden op de staart gemarkeerd om een onderscheid te kunnen maken
- Bespreking stageverslag
  - Maatregelen die bij proefdieren genomen moeten worden om tot een goede medische beeldvorming te komen
  - Onderzoek: zie bijlage/mail

#### Subcutaan injecteren bij muizen:

*Een onderzoek naar een nieuwe speurstof om tumoren met behulp van een PET-scan op te sporen en waarbij het aantal vals-positieve resultaten verkleind zou kunnen worden. In onderzoek naar tumoren bij de mens kan de meest gebruikte radioactieve speurstof, FDG (radioactief suiker), vals-positieve resultaten veroorzaken, omdat zowel tumoren als inflammatoire reacties zeer veel suikers verbruiken. Hierdoor wordt er bij de patiënten soms een valse diagnose vastgesteld en dit terwijl er enkel een inflammatie voorkomt. Om dit te voorkomen, werden er twee nieuwe speurstoffen op basis van aminozuren ontwikkeld (in plaats van glucose). Deze worden op naakte muizen getest waar subcutaan tumorcellen worden geïnoculeerd of inflammatie wordt geïnduceerd door middel van terpentijn. De perifere tumoren, afkomstig uit de humane cellijnen, worden door muizen afgestoten. Omwille van de afstotingsverschijnselen die ze vertonen, wordt er voor naakte muizen geopteerd. Omwille van hun verzwakt immuunsysteem vertonen ze immunodeficiëntie voor humane cellijnen.*

#### *Vorbereiding:*

1. Klaarzetten van het anesthesietoestel
2. Bij het manipuleren van proefdieren worden altijd handschoenen gedragen
3. Afzuigstelsel voor isofluraan boven het anesthesiebuisje instellen

#### *Methode:*

1. De muis wordt in slaap gebracht door middel van een anesthesietoestel met isofluraan.
2. Wanneer de ademhaling zakt tot twee seconden tussen elke ademhaling kan de muis verplaatst worden naar het anesthesiebuisje op de tafel.
3. Als de muis op het anesthesiebuisje is aangesloten, wordt er een tentje met de huid gemaakt om subcutaan te injecteren.
4. De naald wordt nu voorzichtig in de huid geprikt. Wanneer dit te hard gebeurt, is de kans groot dat de naald de andere kant van de huid doorprikt. Hierdoor kan er bij het inspuiten van de vloeistof een lek ontstaan. In het geval van het doorprikken van de huid, dient men op een andere plaats opnieuw te beginnen. Wanneer de naald goed

*zit, wordt de huid losgelaten om de vloeistof te injecteren. Dit gebeurt met de nodige precisie.*

5. *De naald wordt verwijderd en zonder dop in de gele afvalcontainer gedeponneerd.*
  - a. *Een naald mag je niet 'recappen'. Tenzij de naald afgeschermd moet worden om de monitor niet met radioactiviteit te besmetten. Dit wordt 'recappen met een eenhandsmethode' genoemd.*

## 04/04/2019

- Rondleiding + uitleg over MRI met vijf doctoraatstudenten
- Algemene uitleg over het gebruik en de bijhorende materialen om tot een duidelijke medische beeldvorming te komen en om voor het optimale dierenwelzijn te zorgen.
- Onderzoek naar behandeling van depressie bij ratten door middel van ketamine.
  - Wekenlang werden de ratten dagelijks ingespoten met corticosteroïden (cortisone) om een depressie op te wekken. Met behulp van radioactief suiker (FDG) wordt de hersenactiviteit op een PET-scan in beeld gebracht. Hoe meer activiteit, hoe meer oplichting er te zien is (en omgekeerd).
  - Na deze behandeling worden de ratten met ketamine behandeld. De hersenactiviteit wordt dan met de PET-scan opnieuw gemeten. Bij positieve resultaten van de ketamine-behandeling zou er meer hersenactiviteit worden waargenomen.
  - Aan de hand van deze twee metingen wordt de hersenactiviteit vergeleken en kan men vaststellen of de behandeling aanslaat of niet. Indien de behandeling werkt, dan is de hersenactiviteit gestegen. Daarnaast worden ook de mogelijke bijwerkingen van de ketamine-behandeling onder de loep genomen, met als doel deze te minimaliseren.
  - In het onderzoek wordt er ook een controlegroep voorzien die water krijgt in plaats van de ketamine-behandeling.

### Onderzoek van weefselirritatie bij ratten ten gevolge van implantaten

*Na het inplanten van twee soorten implantaten kan er soms weefselirritatie of kapselvorming voorkomen. Om deze nevenwerkingen te beoordelen worden ratten als proefdieren gebruikt.*

#### *Benodigdheden:*

- *Twee anesthesietoestellen*
- *Scheerapparaat*
- *Weegschaal*
- *Meetlatje*
- *"pamperdoek" (d.i. een ondoordringbare wegwerpdoek)*
- *Kniptang voor oor*
- *Operatiemateriaal*
  - *Schaar*
  - *Naaldhouder*
  - *Naald en niet-resorbeerbare draad (Ethilon® 4-0)(geïmpregneerd)*
  - *Scalpel*
  - *Pincet*
- *Ontsmettingsmiddel: 70% gedenatureerde ethanol*
- *Operatiedoek*

#### *Werkwijze:*

1. *Gasanesthesie starten: isofluraan op 5% + zuurstofgenerator inschakelen.*
2. *De rat wordt met de juiste techniek uit de kooi gehaald en in de anesthesiebak geplaatst.*

- a. *De techniek houdt in dat de staartbasis lichtjes wordt opgetild en het dier op de hand of op de mouw wordt gezet, afhankelijk of de rat bijt.*
3. *De rat wordt in slaap gebracht. Wanneer er een rustige ademhaling waar te nemen is, tussen twee ademhalingen in twee seconden rust, wordt er verder gegaan.*
4. *Vooraleer de rat op de pampendoek gelegd wordt, wordt het dier gewogen. Daarna wordt het isofluraan-gehalte verlaagd naar twee procent.*
5. *Om nadien de ratten nog te kunnen identificeren, wordt er een oorknip gemaakt.*
  - a. *De oorknip gebeurt buiten de zone van de grote bloedvaten. Aangezien de huid ter hoogte van de oren zeer dun is, is de zone goed zichtbaar.*
6. *Om plaats te maken voor zes implantaten wordt de rug van de rat geschoren. Aan de twee zijden van het ruggenmerg worden telkens drie implantaten geplaatst.*
  - a. *Uit vorige onderzoeken bleek dat het scheren van de zone ter hoogte van de scapula voor irritatie zorgt en voor de dieren niet aangenaam aanvoelt. Daarom scheert men tot net onder de scapula.*
7. *Vervolgens wordt de rat door middel van een meetlatje gemeten. Om in het kader van het onderzoek zo volledig mogelijk te zijn, wordt ook het gewicht gemeten. De gegevens worden op de onderzoeksfiche genoteerd, ook de locatie van de oorknip wordt vermeld.*
8. *De rat wordt op het operatieblad met 'operatiedoekje' geplaatst. Dit is een proper papieren zakdoekje. Het controleren van de ligging van de snuit in het anesthesiebuisje is belangrijk. De rug wordt met ethanol ontsmet.*
9. *Met een pincet wordt de huid van de rug opgetild en wordt er een eerste schuine incisie met een scalpel gemaakt.*
10. *Met een schaar wordt het onderhuidse weefsel opengeknipt om een ruimte (een pocket) voor het implantaat te creëren.*
11. *Vooraleer het implantaat ingebracht wordt, wordt het ondergedompeld in vloeistof van 70% ethanol. Na het vinden van de correcte plaatsing wordt de incisie dichtgenaaid met twee à drie enkelvoudige hechtingen.*
12. *In totaal worden er zes schuine incisies op de rug gemaakt, met aan elke zijde een verschillend soort implantaat.*
13. *Om de oppervlakte van de rug tegen kiemen te beschermen, wordt die met Chlortetra® (chlortetracyclinehydrochloride) ingespoten.*
14. *Dezelfde werkwijze wordt bij de zes andere ratten herhaald.*
  - a. *Vier van de zeven ratten werden geïmplanteerd.*

## 05/04/2019

- Voormiddag: INFINITY-meeting
  - Tijdens de INFINITY-meeting wordt er een korte stand van zaken meegedeeld. Alle uitgevoerde proeven en experimenten van de doctoraatsstudenten worden toegelicht.
  - De meeting heeft ook als doel elkaar praktische tips te geven omtrent het onderzoek en problemen en eventuele vragen te bespreken.
- E-mails checken:
  - Richtlijnen / reglementen van INFINITY Lab lezen
  - Samenvatting van de verslagen van de ethische commissie (Jeroen Verhoeven)
- Vervolg weefselonderzoek van implantaten bij ratten:
  - Bij de drie overige ratten werden ook zes implantaten geïmplanteerd.

## 08/04/2019

- Optische beeldvorming (IVIS): vaststellen van lymfomen bij muizen door middel van luciferase.



- Opstarten van tweede deel van onderzoek depressie: de controlegroep
  - Uitvoeren van euthanasie, onder verdoving, bij ratten die aan het einde van hun proef gekomen zijn: intraveneus, in de laterale staartvene, met natrium pentobarbital.
  - Het buikvlies van de geëuthanaseerde ratten wordt samen met de huid weggeknipt. Deze onderdelen worden voor een onderzoek in verband met buikvlies tumoren gebruikt. Hierbij testen ze een bepaalde therapie, anders dan chemotherapie.
- Echografie: hart van muizen
- Controle van de ratten (onderzoek van weefselirritatie bij implantaten).
  - Bij één van de dieren is één van de incisies opengesprongen. Deze werd zorgvuldig dichtgenaaid met twee enkelvoudige hechtingen. Hiervan mocht ik zelf één hechting uitvoeren. Nadien werden de hechtingen opnieuw met Chlortetra<sup>®</sup> (chloortetracyclinehydrochloride) ingespoten.
  - Na een tweede controle bleek dat de hechtingen opnieuw werden open gebeten. De rat werd opnieuw verdoofd en de opening werd met twee enkelvoudige hechtingen gedicht. De hechting werd met cutaan xylocaïne ingespoten.
- Verwijderen van dode muis die met een radioactieve stof werd ingespoten.
  - Dit vereist een specifieke procedure!

*Muizen intraveneus met radioactieve suiker (FDG) injecteren en aan de hand van de PET-scan opvolgen:*

*In het onderzoek naar een speurstof om tumor van inflammatie te onderscheiden, worden de muizen vandaag intraveneus met FDG geïnjecteerd. Het hele gebeuren wordt gedurende één uur lang aan de hand van een PET-scan opgevolgd. Vier uur later wordt dezelfde scan opnieuw uitgevoerd. De eerste scan geeft een dynamisch beeld weer. De verspreiding van de radioactieve stof in het lichaam wordt geobserveerd. Eerst migreert de stof naar het hart en gaat vervolgens naar alle andere organen. De tweede meting (vier uur later) is statisch. Hier wordt er gezocht naar de plaatsen waar de suiker nog steeds aanwezig is. Locaties met een hoge opname van FDG zijn de hersenen (verbruiken veel suiker), eventueel een tumor en plaatsen van inflammatie.*

*Werkwijze:*

- 1. De fijnste naald (30G) wordt gebruikt. De naald wordt van de spuit gehaald en vervolgens aan een fijn buisje vastgemaakt. Dit buisje wordt aan een spuit met fysiologische oplossing gekoppeld.*
- 2. Eerst wordt de muis verdoofd. Daarna wordt de staart met een warmtelamp verwarmd zodat de venen zich openen (vasodilatatie).*
- 3. Met een vaste hand en de vereiste ervaring wordt de laterale vene geprikt. Aan de hand van een fysiologische oplossing kan er gecontroleerd worden of de laterale vene correct werd aangeprikt. In dergelijke situaties worden de venen niet geaspireerd omdat ze te weinig bloed hebben. Daarnaast is de kans dat er een collaps van de laterale vene ontstaat, groot.*
- 4. Wanneer de fysiologische oplossing niet in de staart waar te nemen is, zit de naald correct. Wanneer de oplossing waargenomen kan worden (een wit volume die de staart verdikt), moet de naald verwijderd worden en dient de handeling opnieuw te gebeuren, maar nu wat hoger (dichter naar het lichaam van de muis toe, dus meer proximaal).*
- 5. Nadien wordt de muis naar de PET-scanner overgeplaatst.*
- 6. In de PET-scanner wordt de muis zo snel mogelijk aan het anesthesiebuisje van de scanner gekoppeld en vastgemaakt op een vlak bed dat eenvoudig kan verplaatst worden naar een ander toestel. Wanneer alles klaarstaat, wordt de spuit met de fysiologische oplossing afgekoppeld en start de PET-scan. Tegelijkertijd wordt de muis ook met de radioactieve suiker (FDG) geïnjecteerd. Via de computer wordt dit*



*opgevolgd. Dit is te zien als een stijgende lijn van radioactiviteit. Indien deze stijging te traag gebeurt, betekent dit dat de suiker niet intraveneus werd geïnjecteerd, maar paraveneus.*

## 09/04/2019

- Voormiddag: onderhuidse implantatie van glucosesensors bij ratten
  - Gelijkaardige procedure zoals bij het inplanten van de implantaten bij ratten (zie 4 april 2019)
  - Er werden vier glucosesensors op de rug geïmplant
  - Na enkele uren controle van de hechtingen, niet stukgebeten of opengekrabd.
- Sjabloon stageverslag opmaken + technische fiche bedrijf aanvullen

### Intraveneuze injecties (oefenles):

*Het intraveneus injecteren bij muizen lijkt eenvoudiger dan het is, vooral bij witte en naaktmuizen. In INFINITY Lab zijn de meest gebruikte witte muizen: Balb/c, NOD-SCID en FVB en de meest gebruikte naaktmuizen zijn NMRI, Athymic Nude, Swiss Nu/Nu en de gewone Nu/Nu. De laterale venen zijn bij deze muizen zeer goed zichtbaar, maar het injecteren vraagt veel oefening. Samen met Benedicte gebruikten we hiervoor twee oude muizen die aan het einde van hun proef gekomen zijn. Aan de hand van haar uitleg en demonstraties mag ik op de dieren oefenen.*

### Benodigdheden:

- Insulinespuit 0,5 ml of 1ml
- Fysiologische oplossing (NaCl 0,9%)
- Tubing (20-30cm)
- Anesthesietoestel + zuurstofgenerator
- Warmtematje
- Naaldhouder van Mathieu
- Schaar
- Kleinste naald (30G)

### Werkwijze:

1. De muis wordt in de anesthesiebak met isofluraan verdoofd op stand vijf. Intussen wordt de 'katheter' klaargemaakt.
2. Door middel van de naaldhouder van Mathieu wordt de naald afgebroken. Die wordt aan de tubing bevestigd.
  - a. Belangrijk aandachtspunt: zorg ervoor dat je je niet in de vingers prikt
3. De insulinespuit wordt met een fysiologische oplossing gevuld. De naald hiervan wordt aan het andere uiteinde van de tubing bevestigd.
  - a. De insulinespuit wordt met ongeveer 300µl fysiologische oplossing gevuld.
4. Een warmtematje met een bijhorende anesthesiebuis wordt op de tafel klaargelegd. Eens de muis ingeslapen is, wordt het dier hieraan gekoppeld. Ondertussen wordt de isofluraan naar 1,5 – 2% verlaagd.
5. Om zoveel mogelijk bewegingsruimte met de naald te hebben, wordt de insulinespuit zo dicht mogelijk bij de muis geplaatst.
6. De naald wordt, op eigen manier, in de laterale vene ingebracht.
  - a. Hierbij wordt de staart zo strak mogelijk gehouden, lichtjes naar omhoog en een beetje geplooid. De naald wordt in een lage hoek (ongeveer 15°) in de vene geschoven.
  - b. Er wordt altijd distaal gestart. Indien deze poging mislukt, kan er proximaal opgeschoven worden.

7. *Een tip om te weten of de naald in het bloedvat zit:*
  - a. *Verschuif de naald wat heen en weer. Zo kan je zien of de laterale vene meebeweegt.*
  - b. *Spuut een fysiologische oplossing met een insulinespuit in. Indien de staart oplicht en zich met water vult, zit de naald niet op de correcte plaats.*
8. *Als de naald in de vene zit, wordt die met een druppeltje lijm op de plaats waar de naald in huid zit, vastgemaakt. Nadien wordt er een stukje plakband op de tubing geplaatst en op de staart gekleefd. Het is hierbij van groot belang dat de naald en de tubing niet meer bewogen worden.*

## 3.2 Week 2

10/04/2019

- Oefenen van intraveneus injecteren (op een muis)
- Echografie van de nieren bij muizen
- Dagelijkse controle van de ratten (onderzoek implantaten)
- Röntgenonderzoek of radiografie bij dode zebravissen (Specific Pathogen Free)
  - Verschillende parameters van de X-stralenbuis werden gewijzigd om na te gaan welke de beste resultaten geven.
    - De spanning van de X-stralenbuis (in kV)
    - De stroom doorheen de X-stralenbuis (in mA)
    - Het aantal seconden dat een radiografische film, met daarop de verschillende zebravisjes, werd bestraald.

### Echografie van de nieren bij muizen

*Om de perfusie van de nieren beter zichtbaar te maken, wordt er gebruik gemaakt van microbubblen. Door de bubblen in de nieren te laten barsten, wordt de doorstroming van het bloed sterk visueel weergegeven. Na dit experiment wordt er een bijhorende 3D-scan van de bloedvaten gemaakt.*

*Vorbereiding muis:*

1. *De muis wordt in de anesthesiebak in slaap gebracht met een isofluraanconcentratie van 5%.*
2. *Wanneer het dier goed verdoofd is, wordt het naar de echografietafel overgebracht (isofluraan: 2,5%). Vervolgens wordt de rug, ter hoogte van de nieren, ingesmeerd met een ontharingsmiddel. Als het product na enkele minuten is ingewerkt, worden de haren met een warm, natgemaakt papertje weggewreven.*
3. *Daarna wordt bij het dier een intraveneuze katheter/naald geplaatst en aan een fysiologische oplossing gekoppeld. Wanneer de naald op de correcte plaats zit, wordt de staart aan de echografietafel vastgeplakt.*
4. *Met wat gel worden alle poten op de elektroden van de echografietafel vastgekleefd. Op die manier kan de hartslag en de ademhaling gedurende het onderzoek goed opgevolgd worden.*
5. *Ook de onthaarde rug wordt met gel ingesmeerd. Dit zorgt voor een goede connectie met de echo-probe.*

*Werkwijze:*

1. *De probe van het echografietoestel wordt op een statief geplaatst om zo weinig bewegingsinterferentie te veroorzaken. Vervolgens wordt het statief naar beneden gedraaid zodat de echo-probe goed contact maakt met de gel op het lichaam van het dier. Om luchtballen te vermijden, wordt de echo-probe niet meer van hoogte gewijzigd. Er mag wel nog ter plaatse gedraaid worden om tot een goed beeld te komen.*

2. Eenmaal de nier correct in beeld is gebracht, wordt de spuit met fysiologische oplossing verwisseld met een spuit microbubbels (volume: 5µl).
3. Om een filmpje te maken, drukt men op de knop 'pre trigger'. Tegelijkertijd wordt er een timer gestart en worden de microbubbels in het dier geïnjecteerd. Om de laatste restjes microbubbels in de tubing er vlot door te krijgen, wordt de spuit afgelost door de fysiologische oplossing en injecteert men wat vloeistof.
4. Na 40 seconden wordt er op de knop 'burst' geklikt en barsten de microbubbels. Op die manier wordt er een versterkt signaal van de perfusie verkregen.
5. Na ongeveer 1 minuut en 40 seconden wordt het filmpje beëindigd en opgeslagen. Hierna wordt er een 3D-scan van de bloedvaten gemaakt.
6. In de beelden van het filmpje wordt de nier afgelijnd. Het signaal van de 'burst' wordt aan de hand van een grafiek geobserveerd.
7. Om twee afzonderlijke metingen per muis te hebben, wordt het volledige proces na acht minuten herhaald.
8. Na het onderzoek wordt de echo-probe naar boven gedraaid. Het dier wordt voorzichtig van de echografietafel losgemaakt en wordt van de gel schoongemaakt.
9. Het proces wordt bij alle muizen die onderzocht dienen te worden, herhaald.

## 11/04/2019

- Echografie van het hart bij muizen
  - Onderzoek van hartritmestoornissen na inductie van een hartinfarct. Er wordt nagegaan of er wijzigingen in het contraheren/bewegen van het hart waarneembaar zijn, voor en na het induceren van het hartinfarct.
    - Om een hartinfarct te induceren, werd er gedurende één uur een bloedvat afgeklemd tijdens een operatie. Na één uur werd het hechtdraadje rond het bloedvat terug verwijderd.
- Oefenen van intraveneus injecteren (op een muis)
- Explantatie en implantatie van implantaten bij ratten
  - Ratten die aan het einde van hun proef gekomen zijn, worden door middel van een intraveneuze katheter geëuthanaseerd. De injectie gebeurt in de laterale vene met pentobarbital. Indien het op deze manier niet lukt, gebeurt dit intraperitoneaal. Dit gebeurt onder blijvende verdoving. Bij het inslapen is er een kleurverandering in de ogen waarneembaar. De kleur gaat van helder rood naar dof en grauw.
- Controle van de ratten met implantaten (vorige week en dinsdag 9/04)
  - Als de ratten geen open huidwonden hebben, worden ze terug naar het animalarium gebracht.

### Binnentreden van het animalarium:

Het animalarium is een laboratorium waar ratten, muizen, schapen ... gekweekt en/of voor verzorging gehouden worden. Daarnaast worden ze tijdens een onderzoek dagelijks geobserveerd. Het laboratorium is enkel met badge toegankelijk en er geldt een beperkte omkleedprocedure. Op die manier kunnen buitenstaanders de gebouwen niet betreden en worden de dieren en het personeel beschermd tegen binnenkomende infecties. Om de dieren tegen stress, geluid- en lichtprikkels van buitenaf te beschermen, worden de kooien telkens met een deken of je eigen laboratoriumjas bedekt.

### Procedure:

1. Vooraleer je het animalarium binnentreedt, is het verplicht om de schoenen, achter de rode lijn die op de grond getekend staat, uit te doen. Vervolgens krijg je een ander paar schoenen aan de andere kant van de lijn.
2. Voor je je schoenen uitdoet, neem je een paar schoenen uit het rek en plaats je die achter de lijn. Jouw eigen schoenen plaats je in de kast.
3. In de 'reine' zone wordt er gevraagd om je laboratoriumjas uit te doen.

4. *Vervolgens noteer je je naam in het logboek.*
5. *Om het animalarium zelf te betreden, dien je de laatste deur met een speciale badge te openen. Deze badge geeft enkel toegang tot dit labo.*
6. *Wanneer je muizen of ratten uit een lokaal wil halen, dan dien je wegwerperschoenen te dragen. Aan de deur tussen de gang en het dierenlokaal is er een fysieke barrière (50 cm hoge metalen plaat) waar je je voet op plaatst en de wegwerperschoenen aantrekt. Vervolgens plaats je je voet over de drempel. Voor de andere voet doe je hetzelfde. Wanneer je het lokaal wil verlaten, verwijder je de hoes van je schoen vooraleer je je voet in de gang plaatst.*
7. *De lege kooien uit het INFINITY Lab worden naar het animalarium, de wasplaats, teruggebracht.*
8. *Ook bij het naar buiten gaan, moeten dezelfde handelingen als bij het binnentreden van het animalarium uitgevoerd worden. Nu doe je de speciale schoenen voor de rode lijn uit en trek je over de lijn je eigen schoenen aan.*

### **12/04/2019**

- Oefenen van intraveneus injecteren (op een muis).
- Bespreking stageverslag: inhoudelijk en indeling.

### **15/04/2019**

- Hulp bieden bij het onderzoek: inflammatie en tumoren.
- Muizen intraveneus injecteren en de dieren onder de PET-scan plaatsen.
- Controle van de ratten met implantaten: bij drie ratten diende de incisie opnieuw gehecht te worden.
- Naaktratten intraperitoneaal injecteren: intraperitoneaal injecteren van tumorcellen, afkomstig van peritoneale carcinomatose. De tumor kenmerkt zich door zich als losse cellen doorheen het abdomen te ontwikkelen en zich vast te hechten. Op die manier ontwikkelen de tumoren zich op verschillende plaatsen in het peritoneum. Aan de hand van een BIPAC wil men de chemotherapie in het peritoneum/abdomen vernevelen om na te gaan of dit een effect heeft op uitgezaaide peritoneale carcinomatose.

### Hechten

*De ratten met implantaten worden dagelijks gecontroleerd op een correcte genezing van de wonden. Wanneer er een geopende incisie opgemerkt wordt, wordt dit opnieuw dichtgenaaid en, indien nodig, met weefselijm, Vetbond®, behandeld.*

### *Benodigdheden:*

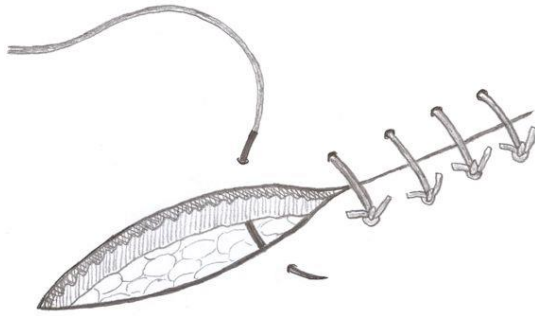
- *Draad geïmpregneerd met een naald*
- *Anesthesietoestel met zuurstofgenerator*
- *Anesthesiebuisje*
- *Papieren doekje*
- *Naaldhouder*
- *Lidocaïne*

### *Werkwijze:*

1. *Als eerste stap wordt de rat in de anesthesiebak met 5% isofluraan-concentratie verdoofd. Wanneer de ademhaling zakt tot twee seconden tussen elke ademhaling kan de rat verplaatst worden en aan het anesthesiebuisje gekoppeld worden.*
2. *Indien er wondvocht aanwezig is, wordt dit met een papieren zakdoekje gedept.*
3. *Wanneer er een wondkorst zichtbaar is, wordt dit, afhankelijk van de ernst, weggeknipt of gewoon met weefselijm behandeld.*

- a. *Op die manier kunnen de randen van de wonde goed aan elkaar gehecht worden.*
4. *Afhankelijk van de wondgrootte worden er twee of drie enkelvoudige hechtingen gebruikt om de wonde te sluiten.*

a. *Een enkelvoudige hechting:*



Figuur 8: enkelvoudige hechting (Mekkes J., 2017)

*Bij een enkelvoudige hechting steek je de naald door de huid, ongeveer 2-3mm weg van de incisie. Eventueel wordt de naald overgepakt in de incisie zelf en wordt een tweede steek gemaakt of wordt de naald, in één keer, terug naar buiten gestoken aan de andere kant van de incisie. Eenmaal de draad er volledig door zit, wordt de draad twee keer rond de naaldhouder omgewonden. Daarna wordt het uiteinde van de draad vastgenomen en wordt er een knoop gemaakt. Dit herhaal je nog twee keer, maar nu draai je de draad maar één keer rond de naaldhouder.*

5. *Om te vermijden dat de ratten na de verdoving de draden of korsten losbijten, brengen we verdovende Xylocaine® (lidocaïne) zalf aan.*
6. *Vervolgens wordt het dier terug in de kooi geplaatst.*

**16/04/2019**

- Echografie en electrocardiogram van het hart bij muizen met een geïnduceerd hartinfarct.
- Controle bij ratten met implantaten.

*PET-scan bij muizen met levertumoren, gevolgd door een CT-scan*

*De muizen werden met een speurstof om prostaatkanker op te sporen intraveneus geïnjecteerd (<sup>18</sup>F-PSMA-11). Er is een vermoeden dat de 'Prostate Specific Membrane Antigen' (PSMA-11) speurstof ook bij levertumoren bruikbaar zou zijn. PSMA-11 is een inhibitor. Het bindt zich op een antigeen dat 'prostaatspecifiek' is en blokkeert het antigeen. Om het onderzoek, waarin meerdere muizen getest worden, vlot te laten verlopen, werd er een strak schema opgesteld. Tijdens dit experiment zijn meerdere onderzoekers nodig.*

*Vorbereidingen:*

1. *De muis wordt verdoofd en vervolgens aan een anesthesiebuisje gekoppeld. Om de intraveneuze katheter vlot en diep genoeg in de laterale staartvene te krijgen, wordt de staart met een infraroodlamp opgewarmd.*
2. *Ondertussen wordt de spuit in het 'hot lab' klaargemaakt, namelijk PSMA-11 dat met radioactief fluor (F<sup>18</sup>) gelabeld is. Er wordt in de dosiscalibrator gemeten hoeveel radioactiviteit de spuit bevat. De gegevens worden genoteerd.*
3. *De spuit wordt in een loden pot naar het animalarium van het labo, waar de muis verblijft, vervoerd. De fysiologische oplossing wordt ontkoppeld en vervangen door de spuit met speurstof. De vloeistof wordt langzaam geïnjecteerd en het tijdstip van injectie wordt genoteerd.*
  - a. *Bovenstaande gegevens zijn belangrijk. Exact één uur na de toediening van PSMA-11 dient de PET-scan te gebeuren.*
4. *Nadien wordt de muis in zijn eigen kooi geplaatst en kan hij daar rustig ontwaken.*

*PET-scan:*

1. *Na iets minder dan één uur wordt de muis opnieuw in de anesthesiebak verdoofd. Dit gebeurt nabij de PET-scanner.*
2. *Vervolgens wordt de muis met tape vastgekleefd aan een vlak bed, dat eenvoudig verplaatst kan worden naar een ander toestel, en aan de anesthesiebuis in de PET-scan gekoppeld wordt. Het vlakke bed wordt met tape aan het bed van de PET-scanner vastgekleefd om verschuivingen tijdens de PET-scan te vermijden.*
3. *De scan duurt veertig minuten.*
4. *Na veertig minuten wordt de muis verplaatst naar de CT-scanner, gebruik makende van het vlakke bed zodat de muis niet te veel beweegt tijdens de verplaatsing. De verplaatsing dient echter correct en snel te gebeuren.*
  - a. *De beelden van beide scans worden op elkaar gelegd om na te gaan welke structuren door de PSMA speurstof oplichten. Wanneer de muis tijdens de verplaatsing verschuift, is het mogelijk dat de twee beelden elkaar niet correct zullen overlappen.*
5. *Nadien wordt de muis in zijn eigen kooi geplaatst en kan hij daar rustig ontwaken.*

### 3.3 Week 3

17/04/2019

- Overlopen eerste evaluatie
- Oefenen van intraveneus injecteren in de laterale staartvene bij een muis

*Echografie van het hart (muis geïnduceerd met hartinfarct)*

*Materialen:*

- *Anesthesietoestel met muizenmasker voor gasanesthesie + muizenmonitor met verwarmde echografieplaat, rectale probe en externe naaldelektroden*
- *Isofluraan*
- *Niet-traumatische plakband*
- *Ontharingscrème (indien het dier nog niet geopereerd werd): was niet nodig voor vandaag*
- *Echogel*

*Procedure:*

1. *Draag handschoenen en vul het logboek van de echografie in: naam en startuur*
2. *Start de computer en het echografietoestel op. In het onderzoek wordt er per muis een nieuwe serie aangemaakt.*
  - a. *In het nieuwe bestand worden de datum (17/04/2019), de naam van het bestand, de geboortedatum en het geslacht van de muis ingevuld.*
3. *De muis wordt in de inductiekamer met 5% isofluraan en 100% zuurstof geanestheseerd. Ondertussen wordt de gel op de elektroden van de echotafel aangebracht en worden er vijf stukjes kleefband klaar gelegd.*
4. *De verdoofde muis wordt op de echografieplaat op zijn rug gepositioneerd. De kop wordt in het muizenmasker geplaatst. Het masker zorgt voor een constante toevoer van 2% isofluraan en 100% zuurstof.*
5. *Met een niet-traumatische plakband worden de poten van het dier in de gel op de elektroden vastgekleefd.*
  - a. *Hierbij is het belangrijk om de voorpoten niet te veel te spreiden. Dit kan de ademhaling beïnvloeden.*
  - b. *Op het computerscherm wordt er nagegaan hoe de ademhaling en de hartslag functioneren.*

6. *Indien de muis nog niet geopereerd werd, wordt het borsthaar door middel van de crème verwijderd.*
7. *Om de temperatuur te meten, wordt de huid aan de geslachtsdelen voorzichtig opgetild en wordt de probe in de anus geschoven.*
  - a. *De lichaamstemperatuur van de muis dient constant op 37°C gehouden te worden.*
  - b. *Doorheen het onderzoek wordt de muis af en toe met een infraroodlamp verwarmd. Een te lage temperatuur kan een daling van de ademhaling veroorzaken.*
8. *De naaldelektroden worden subcutaan in de oksels en liesplooien geprikt. Op die manier wordt er een electrocardiogram gemaakt om de hartslag te meten (ongeveer 500 slagen per minuut).*
9. *Er wordt wat gel op de onthaaarde borstkas gesmeerd.*
10. *Afhankelijk van de beelden die gemaakt moeten worden, wordt de echo-probe met de vrije hand op de borstkas gedrukt of wordt er met een statief gewerkt.*
11. *Er worden verschillende beelden van het hart gemaakt, vooral linker ventriculaire dimensies.*
  - a. *In dit geval wordt er geen statief gebruikt. De apicale zijde van het hart en de vier kamers is zichtbaar. Men probeert ook de Pulse Wave (PW) en de TDI Tissue Doppler Imaging (TDI) vast te leggen.*
    - i. *PW: aan de hand van de mitralisklep de snelheid van de flow berekenen*
    - ii. *TDI: functie van de mitralisklep observeren*
12. *Wanneer de beelden met de vrije hand gemaakt worden, worden de elektronen van de electrocardiogram (ECG) voorzichtig verwijderd en met alcohol ontsmet.*
  - a. *De ECG-opname duurt ongeveer een halfuur. Tijdens een tijdspanne van dertig minuten kunnen ook de abnormaliteiten geobserveerd worden.*
13. *Wanneer het onderzoek is afgerond, wordt de gel van de muis verwijderd en wordt de echo-probe schoongemaakt.*
14. *De muis wordt naar zijn kooi gebracht en door een infraroodlamp verwarmd.*
15. *De tafel wordt schoongemaakt en ontsmet. De computer en het echografietoestel worden uitgeschakeld. Ook de isofluraan wordt op 0% gebracht en de zuurstofgenerator wordt uitgezet.*

## 18/04/2019

- Proefdieren terugbrengen naar het Animalarium
- Oefenen van intraveneus injecteren bij een muis, gevolgd door een euthanasie
  - Euthanasie: cervicale dislocatie onder verdoving (enkel toegekeken)
    - Met twee vingers wordt er een V-vorm net achter de schedel gevormd.
    - De schedel moet goed voelbaar zijn en tussen de twee vingers vastgeklemd worden.
    - Eens de muis goed gefixeerd is, wordt de staartbasis tot de nekwerfels uit elkaar getrokken. Dit gebeurt door aan de staartbasis te trekken. Dit is zichtbaar en voelbaar als een “plop”.
- Echografie van de nieren (bij muizen) met behulp van microbubbles + bijhorende 3D-scan van de bloedvaten (voor tumornecrosefactor (TNF)-injectie).

### Controle ratten met implantanten

*Dagelijks worden de hechtingen gecontroleerd. In sommige gevallen worden de draden stukgebeten en dienen ze opnieuw gehecht te worden. Daarnaast is het ook belangrijk om de korstvorming en de roodheid/zwelling goed op te volgen. Vandaag merkten we een*

gezwel bij een rat op. Om na te gaan of het om een ontsteking of een abces ging, werd het gezwel met een spuit doorprikt. Men probeerde vloeistof op te nemen.

*Werkwijze:*

1. De rat wordt geanestheesd.
2. De haren rondom en op het gezwel worden afgeschoren en met 70% ethanol ontsmet.
3. Met een steriele naald en spuit wordt het gezwel aangeprikt om na te gaan om welk vocht het gaat.
  - a. Bij een eerste poging is het mogelijk om 1 ml helder ontstekingsvocht op te zuigen. Een heldere substantie betekent 'positief' resultaat.
  - b. Na diverse pogingen, op verschillende plaatsen, wordt er nog een halve ml opgezogen.
  - c. Bij de laatste poging werd er opnieuw helder vocht gedetecteerd, maar ook eveneens donkerrood vocht. Door deze waarnemingen wordt er besloten om het gezwel open te snijden.
4. De rat werd een halfuur later opnieuw in slaap gebracht om vervolgens het gezwel open te snijden.
  - a. Ondertussen was het gezwel met vocht opgevuld en stond het opnieuw gezwollen.
5. Aan de rand van het gezwel werd er een incisie gemaakt. Kort daarna volgde er veel bloedverlies. Om onderhuids een duidelijk beeld te behouden, wordt het bloed regelmatig weg gedept. Uiteindelijk was er een tweede incisie van een harde kapselvorming terug te vinden. Vocht/bloed en een stinkende geur werden waargenomen. Dit wijst op een abcesvorming.
6. De firma die de implantaten produceert, werd opgebeld om na te gaan of het implantaat, in functie van het welzijn van het dier, verwijderd kon worden. De verantwoordelijke kwam ter plaatse om het gezwel/incisie te onderzoeken. Er werd besloten om de kapselvorming en het implantaat weg te nemen.
7. Vooraleer het kapsel verwijderd wordt, werd eerst het implantaat weggenomen.
8. Om het kapsel te verwijderen en van het omringend vastgegroeid weefsel los te maken, werd het weefsel rondom het kapsel doorgeknipt.
  - a. Tijdens deze handeling klemde de assistent de huid of de kapselvorming vast om een beter zicht en meer ruimte te creëren. Op die manier kan het kapsel vlotter weggesneden worden. Ondertussen werd het overtollige bloed/vocht met een papieren zakdoekje verwijderd.
9. Het kapsel was aan het peritoneum verankerd waardoor een deel van het peritoneum samen met het kapsel verwijderd moest worden. Het was onvermijdelijk om het kapsel volledig weg te nemen zonder schade aan te richten.
10. In samenspraak met de firma werd er besloten om de resterende implantaten te verwijderen en het dier te euthanaseren.
11. Een spuit werd met 0,4ml Natrium Pentobarbital<sup>®</sup> (natrium pentobarbital) gevuld. Er werd een katheter in de laterale vene geplaatst. Op een rustig tempo wordt de vloeistof gelost.
12. Nadien werd de rat in een plastieken zakje gewikkeld en in de diepvries opgeborgen, in het vakje 'nooit ingespoten'.
13. De werktafel en het materiaal werden opgeruimd, schoongemaakt en ontsmet.

**23/04/2019**

- Opstarten van een SARRP, MP1 controller en dergelijke
- Onderzoek van CT-scan SARRP in functie van beeldvorming, besturings- en bestralingssysteem.
  - Tijdens dit onderzoek worden geen proefdieren gebruikt, maar een fantoom met verschillende films.



- Er wordt nagegaan of de dosis, weergegeven door de software, de exacte dosis zal zijn die op kleine oppervlakken bestraald wordt. In kleine oppervlakken worden er meestal afwijkingen teruggevonden.

#### IVIS Imaging bij ratten met een abdominale tumor

Onderzoek van tumorcellen, afkomstig van peritoneale carcinomatose. De tumor kenmerkt zich door zich als losse cellen doorheen het abdomen te ontwikkelen en zich vast te hechten. Op die manier ontwikkelen de tumoren zich op verschillende plaatsen in het peritoneum. Aan de hand van een BIPAC wil men de chemotherapie in het peritoneum/abdomen vernevelen om na te gaan of dit een effect heeft op uitgezaaide peritoneale carcinomatose.

#### Werkwijze:

1. De luciferine wordt door een spuit uit het eppendorf opgenomen. Het is belangrijk dat de luciferine goed opgewarmd is.
  - a. Luciferine wordt bewaard in de diepvriezer. Om de luciferine vloeibaar te maken en om geen te koude vloeistof intraperitoneaal te injecteren, wordt het bijverwarmd tussen de handen.
  - b. Om het verlies van de werking tegen te gaan, wordt luciferine in het 'donker' bewaard.
2. De rat wordt in de inductiekamer verdoofd. Wanneer de ademhaling tot 1 à 2 ademhalingen per twee seconden is gezakt, betekent dit dat de rat voldoende is geïnduceerd.
3. De rat wordt naar het IVIS-toestel overgeplaatst, waar hij op zijn rug wordt gelegd.
4. De naald wordt in het linkerkwadrant intraperitoneaal geprikt.
5. Na vijf minuten wachttijd wordt de rat bestraald en wordt de tumor aan de hand van een infraroodspectrum in beeld gebracht.

#### Principe IVIS:

IVIS is een toestel gebaseerd op bioluminescente-imaging. In het kader van het onderzoek gebruiken ze genetisch gemanipuleerde tumorcellen, waarbij het desoxyribonucleïnezuur (DNA) tijdens gans het delingsproces blijft delen zonder zijn oorspronkelijke waarde te verliezen. Het DNA bevat onder andere het luciferasegen. Op die manier zijn de tumorcellen in staat om luciferase aan te maken. In de tumorencellen zal het ingespoten eiwit luciferine met het enzyme luciferase en adenotriphosphate (ATP) reageren. Wanneer die reactie ontstaat, zal luciferine binden met zuurstof waardoor er energie vrijkomt in de vorm van licht en CO<sub>2</sub>. Deze techniek laat toe dat de onderzoekers de tumorgroei van heel dichtbij kunnen opvolgen, maar ook de effecten van de behandelingen en het geneesmiddel zeer nauwkeurig kunnen meten (Van Wiele P., 2018).

De hoeveelheid uitgezonden licht wordt aan de hand van een kleurschaal weergegeven: blauw betekent dat er weinig licht is en dat er op die plaats een beperkt aantal tumorcellen aanwezig is. In tegenstelling tot blauw betekent dat er bij rood heel veel licht te zien is. Er is dus een groot aantal tumorcellen op die plaats gelokaliseerd. Bioluminescente-imaging is een toepassing van de drie R'en. Namelijk 'Refinement': tumorcellen kunnen op deze manier zeer vroeg gedetecteerd worden. De effecten van een welbepaalde therapie kunnen op die manier beoordeeld worden. 'Reduction': er moeten minder dieren gebruikt worden, aangezien deze techniek zeer nauwkeurig en betrouwbaar is (Van Wiele P., 2018).

#### 24/04/2019

- MRI: evalueren van resultaten van twee verschillende naalden die met een virale vector in de hippocampus zijn geïnjecteerd.
  - Voorproef van het eigenlijke onderzoek: er bleken problemen op te treden waarbij er schade in de hersenen werd waargenomen. Deze problemen mogen niet voorkomen.

- Met het nieuwe onderzoek wil men nagaan of het gebruik van de naalden (oude / nieuwe en fijnere) een verschil maakt op vlak van hersenschade.
- Sommige ratten vertoonden afwijkingen (vocht) die niet mogen voorkomen. Anderen vertoonden geen afwijkingen. Het is zoeken naar de precieze oorzaak van de afwijkingen.
- Echografie van de nieren (bij muizen) door middel van microbubbels + bijhorende 3D-scan van de bloedvaten

#### Echografie van het hart bij zebravissen:

*Zebravissen, de lagere diersoort maar toch nog altijd gewervelde dieren, zijn onderverdeeld in twee verschillende groepen. De ene groep bestaat uit vissen die een CRISPR-CAS-techniek hebben ondergaan. De andere groep wordt als controlegroep gebruikt. De zebravissen die gebruikt werden bij de techniek, ondergingen een mutatie in het DNA om een hartafwijking te ontwikkelen. Om het ribonucleïnezuur (RNA) te bepalen, wordt het hart na de echografie, waarbij de bloedtoevoer van en naar het hart in beeld werd gebracht, uit het lichaam gehaald. Aan de hand van deze resultaten wordt er een gerichte therapie tegen hartafwijkingen ontwikkeld.*

#### Werkwijze:

1. De vis wordt met een fijn visnetje in een potje met Tricaïne<sup>®</sup> (tricaïne) (een lage dosis) overgebracht. Éénmaal de vis in het verdovingsmiddel zit, wordt de timer gestart.
  - a. Aangezien het hartritme van de vissen geobserveerd wordt, mogen de dieren maximaal vijf minuten verdoofd zijn. Indien dit langer duurt, zal het hartritme dalen.
2. De vis wordt met een plasticen lepel overgebracht op een spons. Aan de rand van de spons is er een snede gemaakt. Hierdoor kan de vis op zijn laterale zijde rusten.
3. De spons wordt in een verwarmde tricaïne bak overgebracht en wordt naar de bodem geduwd door een niet-drijvend voorwerp.
4. De echo-probe wordt ter hoogte van het hart gepositioneerd. De bloeddorstrooming van en naar het hart wordt geobserveerd.
5. Na de echografie wordt de vis met een plasticen lepel uit de bak gehaald en wordt het dier gewogen.
  - a. Door middel van een analyseweegschaal worden de zebravissen gewogen. In de weegschaal ligt een petrischaal. Er wordt op 'zero' gedrukt en vervolgens wordt de vis op de weegschaal gelegd. Resultaat: 200mg – 400mg
6. Wanneer het onderzoek afgerond is, wordt de vis in een verwarmd waterbadje gelegd.

**25/04/2019**

#### Volledige dag MRI-scans bij muizen uitvoeren + werking van MRI

*Doel van het onderzoek: de proefmuizen werden met neurotoxine kainaat in de hippocampus geïnjecteerd. Dit neurotoxine veroorzaakt veranderingen in de hippocampus, delen van de hippocampus sterven af. Hierdoor worden muizen ziek en ontstaan er na enige tijd spontane subklinische aanvallen, zoals koorts- of epilepsieaanvallen. Het doel van het onderzoek is het ontwikkelen van een behandeling voor deze subklinische aanvallen op basis van een virale vector. Er bestaan behandelingen, maar er is nog geen efficiënte werking, de drugs werkt niet op de plaats waar het zou moeten werken. Daarnaast gaat de behandeling met veel bijwerkingen gepaard: lever- en nierfalen ...*

*De hippocampus wordt door neurotoxines aangetast. Daardoor raakt het evenwicht verstoord. Het aantal activerende neuronen zal groter zijn dan het aantal inhiberende. De activerende worden meer geprikkeld en door een overmaat aan excitatie ontstaan er meer aanvallen. Met behulp van een virale vector, een geïnactiveerd virus met genetisch materiaal, wordt er DNA in de cel geïnjecteerd. De DNA-streng wordt door de cel gebruikt en*

receptoren ontstaan. De virale vector is enkel complementair met exciterende cellen. Andere cellen zullen geen reactie vertonen. Op die manier kan het nieuwe geneesmiddel een effectieve werking op de exciterende cellen hebben. Deze cellen werken met de receptor via het 'sleutel-slot'-principe. Indien er een binding tussen het geneesmiddel en de receptor ontstaat, zal de celactiviteit dalen. Bij gevolg zullen er minder epileptische aanvallen ontstaan.

De vorige methode bestaat uit het implanteren van een elektro-encefalografie (EEG)-elektrode, die het verschil in actiepotentialen meet. De methode werkt altijd met dezelfde coördinaten, zowel voor/achter als links/rechts, om deze in de hippocampus te implanteren. Helaas kwam de elektrode na de behandeling met neurotoxines niet in het overgebleven gedeelte van de hippocampus terecht. Omwille van deze resultaten werd er vandaag een MRI-scan van de hersenen uitgevoerd. Op die manier kan er nagegaan worden waar het overige gedeelte van de hippocampus grenst en kunnen de coördinaten achterhaald worden.

Het einde van het onderzoek bestaat uit perfusie van het proefdier. Al het bloed wordt uit het hart gespoeld en wordt daarna met PBS (Phosphate buffered saline) doorlopen. Als laatste wordt de bloedsomloop met formol doorlopen. Op die manier worden alle weefsels en organen gefixeerd en kunnen we de hersenen gebruiken om coupes te maken.

De MRI-scan wordt voorafgegaan door verschillende voorscans. In een eerste scan worden drie coupes van de hersenen genomen: een coupe door het axiaal vlak, een coupe door het coronaal vlak en een sagittale coupe. De eerste basisscan wordt gebruikt om te kijken of de rat recht en diep genoeg in de scanner ligt. Als de rat scheef ligt, kan dit in de software gecorrigeerd worden. De tweede basisscan lijkt op de eerste scan, maar bevat meerdere opeenvolgende coupes per vlak. Op basis van deze scan wordt de volgende scan ingesteld (zodat er dus gecorrigeerd wordt bij scheef liggen en zodat je de gewenste hersenregio in het midden van je scan krijgt). Door de manipulatie van de hoeken wordt het magnetisch veld ook automatisch aangepast en wordt er telkens een beter beeld gecreëerd. Op die manier wordt er een finale scan bekomen.

Vorbereiding scan + materiaal dat nodig is om tot een duidelijke beeldvorming te komen:

- Bruine buis = transmit / receive coil
  - o Dit wordt aan de achterkant van de scanner gekoppeld. Het haakje moet voorzichtig voor het gaatje komen (let op voor de andere kabels), de stekker in de plug steken. Dit gebeurt zorgvuldig. Wanneer er een 'piep' te horen is, is de connectie goed.
- Surface coil = receiver coil
  - o Dit dient aan de voorkant van de scanner gekoppeld te worden. De kabel met stekker wordt eerst door de tunnel van de scan gestuurd en wordt voorzichtig in de plug gestoken.
  - o De kop/hersenen moeten recht onder het plusje, dat op de surface oil is afgebeeld, liggen.
- Warmtematje op scannerbed leggen. De warmte wordt via water geleid.
  - o De temperatuur wordt op 49°C ingesteld.
- Buis met isofluraan op het masker aansluiten
  - o De grootte van het masker is afhankelijk van het dier. Bij een muis wordt er een klein masker gebruikt.
- Wanneer het dier onder de scanner ligt, wordt de sensor voor ECG/ademhaling op het warmtematje gelegd zodat de ademhaling opgevolgd kan worden.
- Om uitdroging van de ogen te voorkomen wordt er zalf gesmeerd.

Werking van een coil: MRI-toestel zendt radiopulsen uit die door het dier ontvangen worden. Het dier reageert op deze radiopulsen en zendt radiopulsen op een andere golflengte uit. De coil vangt deze uitgezonden radiopulsen op en verwerkt dit, aan de hand van de software

van de MRI, tot een beeld. De coil kan verschillende vormen aannemen. In geval van hersenscans wordt een coil rondom de kop van het dier gebruikt.

### 3.4 Week 4

**26/04/2019**

- Echografie van het hart bij muizen (controlegroep)
  - Onderzoek van Ellen Cocquyt en masterstudente Tessy.
- Afwerken van verslag 'dagelijkse werkzaamheden week 3' en informatie i.v.m. mijn stageverslag verzamelen
- Assisteren bij verschillende onderzoeken
  - Intraveneus injecteren
  - Opruimen en ontsmetten

**29/04/2019**

- Lezen van goedgekeurde ethische commissiedossiers i.v.m. dierproeven die momenteel in het INFINITY Lab uitgevoerd worden
- Echografie van de nieren bij muizen, met behulp van microbubbels + bijhorende 3D-scan van de bloedvaten (voor TNF-injectie)

#### Echografie: perfusie van de nieren (samenvatting van het onderzoek)

*Sepsis, door een infectie, trauma of tijdens een operatie veroorzaakt, zorgt voor het ontwikkelen van het ongecontroleerde systemische inflammatoire respons syndroom (SIRS). De huidige behandeling bestaat uit een antibioticakuur met een bijhorende vochttoediening. Uit onderzoek bleek dat deze therapie een onvoldoende efficiënte werking heeft (Delvaeye T., 2019).*

*Sepsis en SIRS worden zichtbaar door de ontwikkeling van vasculaire permeabiliteit. Dit leidt tot bloedvatverwijding, oedema en hypotensie. Het mechanisme dat de ontwikkeling van de vasculaire permeabiliteit veroorzaakt, is ongekend. Door de bloedvaten tegen het ontstaan van permeabiliteit te beschermen, zorgt het ervoor dat het dier of de muizenmodellen tegen sepsis beschermd worden (Delvaeye T., 2019).*

*De drie meest gekende muismodellen om SIRS of sepsis in vivo te bestuderen, zijn TNF-geïnduceerde SIRS, LPS-geïnduceerde endotoxemie of blindedarm ligatie en –punctie. TNF-geïnduceerde SIRS is, naast een welbekend muismodel voor sepsis, ook één van de meest toegepaste in vivo modellen om TNF-signaling te bestuderen. TNF wordt intraveneus bij de muizen geïnjecteerd. Hierdoor ontwikkelen de dieren hypothermie en sterven ze aan systemische inflammatie en orgaanfalen, dit na één tot vier dagen na de injectie (Delvaeye T., 2019).*

*Mixed Lineage Kinase Domain-like (MLKL) eiwit is betrokken bij TNF-signaling. Meer bepaald vormt het de laatste trigger in het proces van necroptose, een gereguleerde vorm van necrose. Het speelt een belangrijke rol in de SIRS-pathologie, aangezien de knock-out van RIPK3, een eiwit upstream van MLKL, leidt tot een volledige bescherming tegen hypothermie en sterfte. Er wordt gespeculeerd dat vasculaire permeabiliteit veroorzaakt kan worden ten gevolge van het afsterven van de binnenwand, endotheel, van de bloedvaten. Er werd reeds onderzoek gedaan naar de rol van MLKL (en dus ook necroptose) in de vasculaire permeabiliteit tijdens TNF-geïnduceerde SIRS. Aangezien een Tie-2 gemedieerde knock-out van MLKL beschermd wordt ter hoogte van de nieren, tegen hypothermie en sterfte, wijst dit op de significante rol van endotheliaal MLKL. Een ander onderzoek toonde ook reeds aan dat er verhoogde waarden van MLKL aanwezig zijn in het bloed van patiënten*

*met sepsis, die op intensieve zorgen opgenomen zijn. Hoe hoger de waarden, hoe slechter de prognose. Dit toont aan dat MLKL een mogelijke interessante biomarker of target tijdens sepsis kan zijn. Een recente studie rapporteerde een significant hoger verschil in de capillaire diameter bij MLKL 'knock-out muizen'. Daarnaast was er ook een verbeterde doorbloeding ter hoogte van de nieren in ischemie/perfusiemodel waar te nemen. Met dit onderzoek wil men achterhalen waarom MLKL Tie-2 knock-out muizen in het TNF-SIRS model tegen sterfte en vasculaire permeabiliteit beschermd zijn. Daarnaast wordt er ook nagegaan of er een betere doorbloeding ter hoogte van de nieren aanwezig is (Delvaeye T., 2019).*

**30/04/2019**

- Schrijven aan stageverslag en dagelijkse werkzaamheden
  - Formuleren van een nieuwe titel (hoofdtitel en tussentitels) + structuur
  - Uitleg vragen in verband met de opbouw van het verslag (deel 2): aandachtspunten
- Dissectie van een rat
  - Stuk van het peritoneum wordt bewaard en verder onderzocht op eventuele tumoren.

Samenvatting van het proefdieronderzoek van Jeroen en Louise (Verhoeven J, 2018)

*PET-scan van 'large neutral amino acid transporter' (LAT1) experimenterende hersentumoren werden veelvuldig getest met behulp van aminozuur PET-tracers. Als resultaat werd een specifieke en sensitieve beeldvorming met een laag achtergrondsignaal verkregen. De afgelopen jaren wees het onderzoek uit dat een aantal perifere tumoren ook LAT1, in grote mate, activeren. Dit kwam onder meer tot uiting bij een colon adenocarcinoma en prostaattumoren. In dit proefdieronderzoek willen ze een aantal muizen met humane cellijnen, afkomstig van perifere tumoren, inoculeren die in vitro LAT1 positief bleken te zijn. Na de ontwikkeling van de perifere tumoren zullen de muizen de drie opeenvolgende dagen met een nieuw ontwikkeld aminozuur PET-tracer 2-FELP (fluoroethyl-L-phenylalanine), de referentie aminozuurtracer Fluoroethyl-L-tyrosine (FET), een tyrosine analogo of het glucose-analoog FDG gescand worden.*

*Werkwijze:*

- 1) *Inoculatie: tien vrouwelijke muizen (stam: Swiss Nu/Nu), zes weken oud, worden met isofluraan onder anesthesie gebracht en met  $2 \times 10^6$  cellen van de LAT1 positieve cellijn ingespoten. De cellen worden via de achterflank van het dijbeen ingebracht. Hierna worden de tumoren twee à drie keer per week aan de hand van calipermetingen opgevolgd. Na voldoende groei van de tumoren (minimum 6 mm diameter) kunnen de dieren een PET-scan ondergaan.*
- 2) *PET-scan: de muizen werden via inhalatie onder anesthesie gebracht. Inductie gebeurt door 5% isofluraan in O<sub>2</sub> en gedurende het volledige onderzoek wordt het dier in slaap gehouden door 1,5% isofluraan in O<sub>2</sub>. Vervolgens wordt er, met behulp van een 30G naald en polyethyleen tubing (PE10), een intraveneuze lijn geplaatst in de laterale staartvene. Deze lijn werd vooraf met fysiologische oplossing aangevuld. Het dier wordt naar de PET-scan overgebracht. De scan wordt gestart en de tracer wordt intraveneus toegediend (5,55 MBq, max in 200 µl). De verdeling van het radiofarmacon wordt, door middel van een dynamische PET-scan, gedurende zestig minuten opgemeten. Nadien worden de dieren onmiddellijk tot bewustzijn gebracht. De drie opeenvolgende dagen zullen de dieren 18F-FDG, 18F-FET en 18F-FELP scans ondergaan. De muizen worden de avond voordien telkens nuchter gezet.*

## 02/05/2019

- MRI bij ratten: hersenen (voor de 'impact')
  - Om na te gaan of een MRI-scan microbloedingen in beeld kan brengen, worden er eerst beelden voor en na de werkelijke impact gemaakt. Op die manier kunnen de beelden met elkaar vergeleken worden.
  - Het geven van de 'impact' wordt op maandag 6 mei uitgevoerd.
- Explantatie van implantaten bij ratten (04/04/2019)
  - Er werden telkens twee van de zes implantaten verwijderd en gecontroleerd op littekenweefsel, doorbloeding, kapselvorming en moeilijkheidsgraad van verwijdering.

## 06/05/2019

- Hulp bieden in het onderzoek: perfusie van bloedvaten ter hoogte van de nieren (na TNF-injectie)
  - Vandaag werden de dieren met TNF geïnjecteerd. Na twee uren wordt er een eerste meting uitgevoerd, een tweede volgt na zes uren. Na twee uren verwachten we een verlaagd signaal van de microbubbel omdat er inflammatie in de bloedvaten ontstaat. Als reactie op de inflammatie worden er cytokines geproduceerd. Hierdoor treedt er vasoconstrictie op. Na zes uren verwachten we het omgekeerde: het endotheel van de bloedvaten wordt permeabel. Hierdoor ontstaat er 'lekkage' en is er dus geen verhoogd signaal van microbubbel.
- Impact toedienen bij ratten

### Impact toedienen bij ratten (onderzoek van Kim Braeckman)

*Met dit kort onderzoek wil men aantonen dat een MRI-scan microbloedingen in de hersenen niet in beeld kan brengen. Om microbloedingen te creëren wordt er een impact toegediend.*

*Deel 1: de ratten worden verdoofd en er wordt buprenorfine subcutaan geïnjecteerd. Door middel van een 'tentje', dat gemaakt wordt van de huid, wordt de naald onder de huid geprikt. De rat zal ontwaken in zijn kooi en de buprenorfine zal zijn werking in het lichaam doen.*

### *Deel 2:*

- 1. Na een halfuur wordt de rat opnieuw verdoofd. De pijnstilling is ondertussen ingewerkt. Dit is te merken aan de oppervlakkige ademhaling en het versufte dier.*
- 2. Wanneer de rat verdoofd is, wordt de staart met een infraroodlamp verwarmd. Vervolgens wordt de katheter gestoken.*
- 3. De katheter dient om, na de impact, zo snel mogelijk vloeistof toe te dienen. Een impact kan een hemorragische shock veroorzaken waardoor de bloeddruk kan wegvallen. Door de katheter kunnen we de bloeddruk artificieel meteen door vochttoediening doen stijgen.*
- 4. Nadien wordt de kop van de rat, ter hoogte van de schedelbasis, geschoren en met 70% ethanol ontsmet (ethanol op papieren doekje zodat de vloeistof niet in de ogen terechtkomt).*
- 5. Lokaal wordt er nog Xylocaïne® 2% (lidocaïne hydrochloride) intradermaal ingespoten om, na de impact, zoveel mogelijk hoofdpijn te vermijden. We doen dit ook omwille van de wrijvingen die we op de hersenen aanbrachten.*
- 6. De huid, ter hoogte van de hersenen, wordt strak getrokken. Dit gebeurt door de huid aan weerszijden naar de zijkanten te trekken. Er wordt met een scalpel een incisie gemaakt.*
- 7. Eenmaal de incisie aangebracht werd, wordt die verder opengeknipt.*

- a. *De vliezen, gelegen tussen de schedel en de huid, wordt zoveel mogelijk verwijderd. Vliezen hebben een gladde en glanzige structuur. Ze kunnen ervoor zorgen dat de 'helm' met de schedelbasis niet goed verankerd zit. Hierdoor ligt de helm niet stabiel op de schedel. Door de vliezen zoveel mogelijk weg te knippen of met een wattenstaafje weg te wrijven, wordt er een ruwe structuur op de schedel gecreëerd. Deze structuur zorgt ervoor dat de helm goed op de schedelbasis gevestigd kan worden.*
- b. *Een helm bestaat uit twee eurocentjes van één cent die aan elkaar gelaserd worden. Deze eurocentjes worden voor en na elk gebruik met ethanol 70% gedesinfecteerd.*
8. *Door middel van een druppel weefsellijm op de schedelbasis en de helm worden ze aan elkaar vastgekleefd.*
9. *Met een pincet wordt de huid, rondom de helm, zoveel mogelijk van de helm losgemaakt. Omdat de huid de helm niet mag verschuiven, dient de huid rond de helm te liggen.*
  - a. *Vooraleer de impact wordt toegediend, wordt de helm goed gecontroleerd.*
10. *De rat wordt overgeplaatst naar de ruimte waar de impact gegeven zal worden. Het dier wordt daar zo snel mogelijk aan het anesthesiebuisje gekoppeld.*
  - a. *Het Marmarou-systeem wordt eerst op een plunchen rat getest. Op die manier kunnen de effecten vooraf geobserveerd worden en weten de onderzoekers hoe het onderzoek uitgevoerd moet worden.*
11. *Het Marmarou-systeem is een katrolsysteem waarbij er op een hoogte van één meter een gewichtje van 450 gram gehouden wordt. Het dier ligt daarbij op een speciale mousse. De veerkracht van de mousse speelt een rol bij het geven van de impact.*
12. *Wanneer het metalen staafje exact met de helm op de kop van de rat staat, kan de impact uitgevoerd worden. De assistente telt af en laat de koord los. Het gewicht valt op de helm. Het is de bedoeling dat wanneer de metalen staaf terugkaatst (door de veerkracht) de rat weggehaald wordt. Op die manier wordt een tweede impact vermeden.*
13. *Door de impact ademt de rat even niet meer, daardoor wordt de anesthesie even gestopt. Wanneer de ademhaling terugkomt, wordt er 1 ml fysiologische oplossing intraveneus toegediend.*
14. *De rat wordt opnieuw op de operatietafel geplaatst, waar de helm verwijderd wordt.*
15. *De bloeding wordt gedept. Morgen wil men tijdens de scan nagaan of er microbloedingen in de hersenen aanwezig zijn. De externe bloedingen zijn hier niet belangrijk.*
16. *Nadien wordt de incisie door, afhankelijk van de lengte, een aantal enkelvoudige hechtingen gesloten. Op de hechtingen wordt er een laag Xylocaïne® (lidocaïne hydrochloride) zalf aangebracht.*

## 3.5 Week 5

07/05/2019

- Echografie van het hart bij muizen (controlegroep)
  - Onderzoek van Ellen Cocquyt en masterstudente Tessy.
- Stageverslag: 'inleiding' en 'dagelijkse werkzaamheden week 1 en 2' aan de hand van de feedback aanpassen
- MRI-scan bij ratten met een impact: de beelden worden met de vorige scan (02/05/2019) vergeleken
  - Bij mensen met een zwaar trauma aan de hersenen, veroorzaakt door een botsing of valpartij, wordt er in een later stadium moeilijkheden op vlak van concentratie en geheugen vastgesteld. Met dit bijkomend onderzoek wil er aangetoond worden dat microbloedingen na een trauma, in dit geval een

impact (zie 02/05/2019), door middel van een MRI-scan niet waar te nemen zijn. Vaak wordt er een foutieve klinische diagnose gesteld. De patiënten worden met het advies om Dafalgan te nemen, naar huis gestuurd terwijl er wel degelijk schade aan de hersenen kan zijn.

### 08/05/2019

- Explantatie van glucosesensors + euthanasie van twee ratten die aan het einde van hun proef gekomen zijn.
- Echografie van het hart bij muizen
  - Vier weken na het induceren van een hartinfarct worden er opnieuw een ECG en echografische opnames van het hart genomen.
- Werken aan stageverslag

### 09/05/2019

- Werken aan stageverslag
- Echografie: onderzoek naar perfusie van de nieren bij muizen

#### Resultaten: echografie van de nieren (eigen bevindingen)

*Vandaag werden de muizen intraveneus met TNF geïnjecteerd. De eerste en de tweede meting, met microbubbels, gebeuren respectievelijk twee en zes uur na de injectie. Tijdens het onderzoek wordt de lichaamstemperatuur van de muizen opgevolgd. De dieren kunnen in de vier dagen na de injectie hypothermie ontwikkelen en aan systemische inflammatie en orgaanfalen overlijden. In het belang van hun welzijn, worden de muizen diezelfde avond nog door middel van een cervicale dislocatie geëuthanaseerd. Nadien wordt het abdomen opengeknipt om het bloed, rechtstreeks uit het hart, te prikken. Met een naald wordt er loodrecht in het hart geprikt en wordt het bloed, met alle precisie, opgezogen. Het bloed wordt later voor het bepalen van het MLKL-gehalte gebruikt.*

*Tijdens het onderzoek werd er een duidelijk verschil tussen knock-out muizen en de wildtypes waargenomen. Bij de knock-out muizen waarbij het MLKL-gen uitgeschakeld is, was er een significant tragere hypothermie waar te nemen. Enkele uren na het onderzoek was er gemiddeld 3-4°C verschil in temperatuur in vergelijking met de wildtypes op te merken. Ook tijdens het onderzoek naar perfusie werd er opgemerkt dat de knock-out muizen veel sterker waren dan de wildtypes. Op het einde van de proef had het wildtype slechts een hartslag van 200, bij de knock-out muizen lag dit rond 400 – 500 slagen per minuut. De ademhaling was ook zeer zwak tot nauwelijks waarneembaar bij de wildtype muizen. Dit wijst op een sterke verzwakking van het dier. Met deze visuele waarnemingen kunnen we duidelijk stellen dat het MLKL-gen toch een grote invloed op de ontwikkeling van sepsis heeft.*

### 10/05/2019

- Werken aan stageverslag

### 11/05/2019

- Bioluminescentie: opvolging van ratten met abdominale tumor, afkomstig van peritoneale carcinomatose.
  - Vooraleer het onderzoek kan starten, moeten de dieren efficiënte tumoren bevatten die voor het onderzoek geschikt zijn. Enkel zo kan het onderzoek slagen.



- Werken aan stageverslag

## 3.6 Week 6

14/05/2019

- MRI-scan één week na de impact: opvolgen van de ratten
- Intraperitoneaal injecteren van tumorcellen bij ratten
  - Een paar weken geleden werden er bij de ratten tumorcellen geïnjecteerd. Aan de hand van bioluminescentie waren er geen tumoren in het abdomen waar te nemen. Omwille van deze reden worden de ratten voor een tweede keer geïnjecteerd.
- Echografie: perfusie van de nieren bestuderen

### Werkwijze: Intraperitoneaal injecteren

*Er gaan enkele gevolgen met een intraperitoneale injectie gepaard. Er bestaat een kans dat er beschadiging aan de inwendige organen aangebracht kan worden. Bij de handeling is het belangrijk dat de muis of rat met de rug op de hand ligt. De hand wordt lichtjes naar beneden gekanteld zodat het lichaam hoger ligt dan de kop. Hierdoor zakt de lever in de ribbenboog. De plaats van de injectie ligt naast de mediaanlijn. Op deze manier wordt het aanprikken van de urineblaas vermeden. Naast de plaats speelt de handeling met de naald ook een grote rol. De naald moet in de linker caudale kwadrant geprikt worden, niet te horizontaal en niet te verticaal. Indien dit toch gebeurt, schuift de naald tussen de buikwand en de nier in of is de kans groot dat de nier aangeprikt wordt. De kans dat de darmen aangeprikt worden is minimaal. De organen zijn zo beweeglijk dat ze door de beweging van de naald wegschuiven. Als laatste is de lengte van de naald ook belangrijk. Een korte naald kan minder schade aanbrengen (Van Wiele P., 2018).*

15/05/2019

- Vriesmicrotroom: snijden van coupes (tumor)
- Werken aan stageverslag
- MRI-scan van verschillende ijzersoorten
  - MRI biedt intrinsiek al een vrij goed contrast tussen de verschillende weefseltypes; zelfs het zachtweefselcontrast is meer dan goed zichtbaar. Om het contrast tussen verschillende weefsels nog verder te verhogen, kunnen er contrastmiddelen gebruikt worden. Deze middelen kunnen ofwel een positief (verhoogd signaal) of een negatief contrast (signaaluitval) genereren. Voor die laatste groep wordt er gebruik gemaakt van partikels die ijzeroxide bevatten. Ijzer verstoort het lokaal magneetveld en zorgt lokaal voor signaaluitval, ongeveer vijftig keer groter dan de grootte van het partikel. (Shapiro et al., MRM, 2005). Door de ijzerpartikels te functionaliseren (vb. door een antilichaam of andere moleculen aan de coating van het ijzerpartikel te hangen), kunnen de ijzerpartikels zeer gericht naar bepaalde plaatsen migreren en daar blijven. Op die manier wordt de specificiteit van MRI enorm opgedreven. Het onderzoek naar het gebruik van gefunctionaliseerde ijzerpartikels bij MRI staat relatief gezien nog in zijn kinderschoenen. Één van de eerste stappen is steeds een in vitro onderzoek, waarbij de partikels eerst in een oplossing en later in celculturen worden overgebracht. Vervolgens worden de eigenschappen ervan onderzocht. Pas in een later stadium kunnen nieuwe producten in vivo getest worden.

### 16/05/2019

- Werken aan stageverslag: aanpassen aan de hand van de feedback van de interne stagebegeleiders
- Echografie: perfusie van de nieren bestuderen
  - Drie vrouwelijke muizen werden intraveneus met TNF geïnjecteerd. Het onderzoek naar perfusie werd twee en vier uur na de injectie uitgevoerd. Daarnaast werd er ook een temperatuurmeting gedaan.

### 17/05/2019

- Werken aan stageverslag
- Echografie: perfusie van de nieren

### 20/05/2019

- Rondleiding in 4Brain Lab: de verschillende laboratoria en de procedures van het onderzoek werden toegelicht
  - Operatiekamer: in deze kamer worden alle hersenoperaties uitgevoerd
    - Door middel van verschillende instrumenten werd er gedemonstreerd hoe elektroden in de hersenen worden ingepland. Hierbij is het belangrijk om de twee basiscoördinaten (B en L) te vinden. Op die manier kunnen de verschillende hersendelen gelokaliseerd worden.
  - Laboratorium
    - Dit labo wordt voor processen, zoals het kleuren van histologische coupes van de hersenen, gebruikt. Ook de elektroden worden hier gemaakt.
    - Na de rondleiding kreeg ik de kans om zelf een elektrode te creëren.
  - EEG-lokalen
    - In de verschillende EEG-lokalen verblijft een groot deel van de muizen en ratten. De ratten worden onderverdeeld in acute en chronische ratten. Een acute rat kreeg een plotse hersenbloeding, terwijl de chronische ratten op lange termijn opgevolgd dienen te worden en dus lang aan de effecten van een hersenbloeding worden blootgesteld. Deze dieren kunnen een week lang aan een EEG-toestel gekoppeld worden.
    - Er waren ook ratten die in een kooi aan een elektrode gekoppeld werden en die ondertussen een EEG-test ondergingen.
  - Een apart lokaaltje waar fysieke experimenten worden uitgevoerd.
    - Testen van de tastzin: ratten tasten de nieuwe omgeving met hun poten af. Voor de inductie van een hersenbloeding zal er een evenwicht zijn tussen rechter- en linkerpoot. Na een hersenbloeding kan de tastzin in de rechterhelft van de rechterpoot opmerkelijk verminderd zijn.
    - Evenwicht: na een hersenbloeding wordt het dier gestimuleerd om over een dunne balk te lopen. Er wordt verondersteld dat de ratten van de balk zullen vallen.
    - Reflexen: ratten hebben de gewoonte om hun voorpoot op te heffen wanneer ze een naderende tafel opmerken en dit tegen te houden. Ook katten en honden hebben deze reflex. De reflex is na de hersenbloeding duidelijk niet meer aanwezig.
    - Swim-test: de dieren worden ook gestimuleerd om naar het wateroppervlak te zwemmen. Uit de proeven is gebleken dat ratten die depressief zijn, de neiging hebben om zichzelf te laten verdrinken.

- Dergelijke experimenten vragen veel aandacht op vlak van precisie en de relatie met het dier. Daarom worden de ratten, voorafgaand aan het onderzoek, telkens door dezelfde onderzoeker aangeraakt. Deze mensen voeren dagelijks de 'animal handling' uit. Dit houdt in dat de rat minimum tien minuten op de arm kan blijven zitten. Wanneer ze rustig blijven, worden ze met een snoepje beloond. Indien je merkt dat de rat probeert te vluchten, wordt de kop onder de oksel van de onderzoeker houden en met de hand bedekt. Op die manier krijgen ze het idee dat ze in het donker zitten en worden ze rustiger.

Aanvulling op mijn dagelijkse werkzaamheden: alle handelingen en experimenten die op de dieren uitgevoerd werden, gebeurden enkel onder verdoving. Dit met het doel om zo weinig mogelijk stress bij het dier te veroorzaken. Om de pijn onder controle te houden, worden de dieren na het experiment nog met morfine behandeld. In het INFINITY Lab is het dierenwelzijn één van de belangrijkste aandachtspunten.

De volgende handelingen werden in het laboratorium uitgevoerd:

- Subcutaan injecteren bij muizen en ratten
- Intraveneus injecteren bij muizen en ratten
- Katheter plaatsen bij ratten
- Lijntjes (=katheter) steken bij muizen (oefenen blijft nodig!)
- Hechten
- MRI-scan op punt stellen voor scan bij muizen en ratten
- Voorbereiden van het dier in functie van het onderzoek: verdoven, scheren en oorknip
- Operatie uitvoeren bij ratten: plaatsen en verwijderen van helm op de hersenschedel
- Maken van elektrodes bij EEG-testen bij ratten en muizen

## 4 Persoonlijke visie

### 4.1 Persoonlijke visie op het stagebedrijf

Naar aanleiding van mijn laatste stageperiode had ik al even in gedachten dat ik opnieuw in het laboratorium wou staan. Wat ik echt concreet als stageplaats wou, wist ik nog niet, maar dat het te maken zou hebben met proefdieren was me wel helemaal duidelijk. Toen kwam ik in het INFINITY Lab, Inovative Flemish IN vivo Imaging TechnologY, terecht. Het INFINITY Lab is de preklinische imaging onderzoeksfaciliteit van de Universiteit van Gent. Toen ik dit te horen kreeg, wist ik dat ik in een onbekende wereld terecht zou komen. Daarnaast was ik er ook van overtuigd dat ik de stageplaats met een enorm grote hoeveelheid opgedane kennis zou verlaten. Het Lab is een klein laboratorium waar heel wat toestellen door studenten, van masters tot doctoraatsstudenten, gebruikt worden om hun onderzoek uit te voeren. Daarnaast komen ook werknemers van andere departementen binnen Ugent langs om hun onderzoeksresultaten met medische beeldvorming te versterken. Van PET-scan tot IVIS, alle toestellen worden hier bijna dagelijks gebruikt. Hierdoor deed ik heel wat kennis over de verschillende toestellen op, wat voor een stagiaire een grote meerwaarde is.

INFINITY Lab is een flexibel bedrijf en is eigenlijk voor iedereen toegankelijk. Uiteraard mag er alleen met dieren gewerkt worden als je een FELASA-attest bezit. Het laboratorium bestaat uit verschillende kleine ruimtes waar de toestellen staan. Door afscheidingen tussen de ruimtes en toestellen kunnen anderen de onderzoeken niet verstoren. Enkel in het dierenlokaal, waar alle dieren verblijven, kan het op sommige momenten druk zijn. Het dierenlokaal en het huisvestingssysteem voor ratten en muizen staat gekend als een kleine faciliteit om dieren binnen de correcte omstandigheden te huisvesten, men houdt rekening met de juiste temperatuur en vochtigheidsgraad. Om de cyclus van de kleine proefdieren niet te verstoren, wordt het licht aan de hand van een automatisch systeem ingesteld. Op de drukke momenten is het mogelijk dat de onderzoekers tijdens een operatie of ingreep gestoord worden. Persoonlijk zou ik dit vermoeiend vinden omdat ik graag in stilte geconcentreerd werk.

In de voorraadkasten merk ik wel wat wanorde. Het rek, waar naalden, pampendoeken ... opgeborgen worden, is nogal chaotisch ingericht. De naalden, spuiten ... staan op één plaats bij elkaar verzameld, maar om het nodige materiaal terug te vinden, kan het even duren. Ik zou het rek wat ordelijker maken door er labels aan toe te voegen. Op die manier kan je makkelijk in één oogopslag het gewenste materiaal terugvinden. Er komen heel wat masterstudenten langs, of studenten die hier niet wekelijks aanwezig zijn, voor hen zou het ook makkelijk zijn om alles snel terug te vinden. Daarnaast zou ik ook per kast een label plaatsen. Op die manier is het niet nodig om elke kast te openen.

Indien je nog moeilijkheden ondervindt, kan je steeds bij professor Christian Vanhove en dr. Benedicte Descamps terecht. Deze twee onmisbare figuren leiden alles in goede banen. Ze staan steeds klaar om hulp te bieden, bij problemen of tijdens het onderzoek. Ze beantwoorden vragen. Je krijgt het gevoel dat je in het laboratorium welkom bent.

Het INFINITY Lab staat gekend voor preklinische beeldvorming, wat de visualisatie van levende dieren voor onderzoeksdoeleinden betekent. Beeldvormingsmodaliteiten die vooral niet-invasief en in vivo gebeuren, zijn erg belangrijk geworden in het bestuderen van diermodellen over een langere tijdsperiode. In hun bedrijfsvisie gaat het niet enkel om het bekomen van kwaliteitsvolle beeldvorming, maar ook om het dierenwelzijn zo optimaal mogelijk te houden. Kleine proefdieren en hun welzijn staan binnen dit laboratorium centraal. De dieren worden, bijvoorbeeld, na een chirurgische ingreep of na een impact dagelijks geobserveerd om na te gaan of het herstel van het dier goed verloopt. Bij het vaststellen van pijn wordt er meteen ingegrepen. Dierenleed wordt hier niet aanvaard.

Doorheen mijn stage zag ik geen enkel geval waarin het welzijn van het dier geschaad werd. Ik ben hier heel blij om. Euthanasie blijft voor mij wel een moeilijk onderwerp. Ondanks de goede manier hoe ze hier mee omgaan, brengt toch wat gemengde gevoelens naar boven. Alles gebeurt hier onder verdoving. Op die manier wordt het leven pijnloos beëindigd. Ik kan mij zelf in de bedrijfsvisie vinden en ben er ook heel gefascineerd door. Alles wat hier uitgevoerd of onderzocht wordt, staat in het kader van de humane geneeskunde. Het kan de geneeskunde alleen maar verbeteren.

## 4.2 Persoonlijke visie op je stage en je functioneren.

Op woensdag 3 april 2019 was ik klaar voor mijn eerste dag in de proefdierenwereld. Aan het begin van de lente ben ik in het INFINITY Lab binnengestapt zonder enige kennis. Alle informatie, over alle soorten onderzoeken en toestellen overdonderden mij. Ik wist niet waar ik terecht gekomen was. Ik kreeg de gedachte dat dit voor mij misschien wel te moeilijk zou zijn. Gelukkig vingen professor Christian Vanhove en dr. Benedicte Descamps mij goed op. Ze stelden mij gerust met het feit dat dit voor veel stagiaires nieuw is. Doorheen mijn stageperiode werd ik helemaal opgenomen in een studie die op dat moment uitgevoerd werd. Als stagiaire hier terechtkomen, vergt heel wat inspanning van jezelf. Je moet heel wat informatie doornemen om in de concepten van de onderzoeken te kunnen meedraaien. Op die manier krijg je heel wat meer inzicht, niet enkel in de wereld van de proefdieren, maar ook in die van de mens. Elk onderzoek dat hier wordt opgestart, is in functie van de humane wereld.

De stagedagen vlogen voorbij. Iedere dag stond ik met veel goesting op om opnieuw aan het werk te gaan. Voordien had ik geen ervaring met muizen en ratten, het was een onbekend terrein. De stageplaats bood mij veel leerrijke ervaringen aan. Naar het einde van mijn stage toe, heb ik heel wat dingen geleerd en mogen uitvoeren. Ik leerde hechten, katheters plaatsen in de fijnste venen die er zijn, mocht meewerken aan toekomstige waardevolle projecten ... Ik heb zoveel praktijkervaringen meegemaakt. Deze ervaringen zijn zeer waardevol voor mijn toekomstige carrière in deze medische wereld. Door de positieve feedback en evaluaties zag ik mezelf groeien in de handelingen die ik mocht uitvoeren.

De kennis die ik in de lessen op deed, zag ik op mijn stageplaats terugkomen. Toch miste ik nog heel wat kennis en praktische ervaring. In het vak 'Proefdierkunde' spendeerden we maar een halve dag aan praktijkervaringen. Wanneer je dan in een laboratorium terechtkomt, merk je het tekort aan kennis. De werking en het doel van de verschillende toestellen, zoals MRI-, PET-, SPECT-scan ... zijn ongekend voor een stagiair. Nochtans kwamen de toestellen tijdens de lessen 'medische beeldvorming' aan bod. Deze leerstof was eerder beperkt. Persoonlijk vind ik dit spijtig want ik miste wat basiskennis om de werking van het toestel te begrijpen.

Doorheen mijn stage leerde ik op zelfstandige basis meer en meer bij. Niet enkel door het opzoeken van informatie, maar ook door het assisteren tijdens verschillende onderzoeken. Door regelmatig mee te helpen en de werking van het toestel mee te volgen, mijn vele notities, de vele herhalingen en de vragen die ik in verband met het onderzoek kon stellen, verwierf ik de kennis. De verworven informatie herhaalde ik in mijn eigen woorden. Daarnaast nam ik de commissiedossiers er ook bij. Ook de kennis die ik tijdens mijn vorige opleiding, medisch laborante, verwierf, was tijdens deze stage een meerwaarde. Mijn basiskennis werd regelmatig opgefrist.

Afgestudeerde studenten Dierenzorg kunnen in het INFINITY Lab zeker aan de slag. Hiervoor hebben ze wel een getuigschrift: "personen die actief deelnemen aan op dieren uitgevoerde proeven" nodig. Zonder dit getuigschrift is het niet mogelijk om in het laboratorium te starten. Een dierenverzorger kan hier zeker een meerwaarde zijn, al zou dit wel, omwille van het beperkte werk, met een andere tewerkstellingsplaats gecombineerd moeten worden. Doctoraats- en masterstudenten voeren hier hun experimenten uit. Zij dienen ook de ruimte te krijgen om te leren en kennis te verwerven, waardoor je als dierenverzorger wat overbodig kan zijn. Uiteraard is er de mogelijkheid om mee te helpen als het druk is. Er worden niet enkel experimenten uitgevoerd, ook chirurgische opvolging wordt door de mensen van het INFINITY Lab gedaan. Bij interesse in labowerk in combinatie met het werken met proefdieren, is het aan te raden om ook een diploma 'Biomedische laboratoriumtechnologie' te bezitten. Jobaanbiedingen om met proefdieren te werken, komen in heel beperkte mate voor.

**Lijst met gebruikte afkortingen**

INFINITY	Innovative Flemisch IN vivo Imaging Technology
PET	Positron Emission Tomography
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
CT	Computed Tomography
MRI	Magnetic Resonance Imaging
US	Ultrasound
MEDISIP	Medical Image And Signal Processing
UZ	Universitaire Ziekenhuis
SZ	Sympathisch zenuwstelsel
<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F-Fluorodeoxyglucose
PSMA	Prostate Specific Membrane Antigen
PW	Pulse Wave
TDI	Tissue Doppler Imaging
ECG	Elektrocardiogram
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
RNA	Ribonucleïnezuur
TNF	Tumornecrosefactor
SIRS	Systemische inflammatoire respons syndroom
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domaine-like
LAT1	Large neutral Amino acid Transporter
FET	Fluoroethyl-L-tyrosine
FELP	Fluoroethyl-L-phenylalanine

## Bronvermelding

Bamberg E., Palme R., Meingassner J.G. (2001). *Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats*. Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals 35, 307-314.

Coenen N. (2011). *Kooiverrijking*. [masterproef]. Gent, Universiteit faculteit Diergeneeskunde

Delvaeye T. (2019). Formulier voor de ethische evaluatie van dierproeven. Ethische Commissie Dossier.

Farm Animal Welfare Council (2011). *Five Freedoms*. Geraadpleegd op 15 april 2019 via <http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm>

Fueger B., Czernin J., Hildebrandt I., Tran C., Halpern B., Stout D., Phelps M. and Wolfgang A. (2006). *Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice*. The journal of nuclear medicine.

Himss-Hagen J. (1984). *Thermogenesis in brown adipose tissue as an energy buffer: implications for obesity*. Journal of Nuclear Medicine.

Hetts S., Clark J.D., Calpin J.P., Arnold C.E., Mateo J.M. (1992). *Influence of housing conditions on beagle behaviour*. Applied Animal Behaviour Science 34, p. 137-155.

Hutchinson E., Avery A., VandeWoude S. (2005). *Environmental enrichment for laboratory rodents*. ILAR Journal 46 (2), 148-161.

Innovative Molecular – Imaging and Therapy (2016). Geraadpleegd via <http://imitghent.be/index.html> op 10 oktober 2018

Jennings M., Batchelor G.R., Brain P.F., Dick A., Francis R.J., Hubrecht R.C., Hurst J.L., Morton D.B., Peters A.G., Raymond R., Sales G.D., Sherwin C.M., West C. (1998). *Refining rodent husbandry: the mouse*. Laboratory Animals 32, 233-259.

Lee KH et al. (2005). *Effects of anesthetic agents and fasting duration on 18F-FDG biodistribution and insulin levels in tumor-bearing mice*. Journal of Nuclear Medicine.

MEDISIP. (z.j.). *INFINITY Lab*. Geraadpleegd op 17 mei 2019 via <http://medisip.ugent.be/>

Mekkes J. (2017). *Hechtingen*. Geraadpleegd op 16 april 2019 via <https://www.huidziekten.nl/zakboek/dermatosen/htxt/hechtingen.htm>

Mendl M., Burman O.H.P., Parker R.M.A., Paul E.S. (2009). *Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms*. Applied Animal Behaviour Science 118, p. 161–181.

Mormède P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., van Reenen C.G., Richard S., Veissier I. (2007). *Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare*. Physiology & Behavior 92, p. 317-339.

Muylaert A., (2017). Dierenartsassistentietechnieken: Medische beeldvorming. [cursus]. Roeselare: VIVES Agro- en biotechnologie afdeling Dierenzorg



Pauwelyn G. (2014). *Het effect van één en meerdere intermitterende theta burst stimulatie sessies op de beschikbaarheid van de serotonine transporter in de hersenen bij mannelijke wistar ratten*. [masterproef]. Gent, Universiteit faculteit Farmaceutische wetenschappen

Pihl L., Hau J. (2003). *Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats*. Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals 37, 166-171.

Tseng J-C., Kelada O., Peterson J. (2017). *PET 101: Best Practices for Preclinical 18F-FDG PET Imaging*. PerkinElmer.

Van Wiele P. (2018). Proefdierkunde [cursus]. Roeselare: VIVES Agro- en biotechnologie afdeling Dierenzorg

Verhoeven J. (2018). Formulier voor de ethische evaluatie van dierproeven. Ethische Commissie Dossier.

Vermeulen S. (2012). *Moleculaire en functionele beeldvorming met Magnetische Resonantie Beeldvorming (MRI)*. [masterproef]. Gent, Universiteit faculteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen