

Journal of Visualized Experiments

Murine cervical aortic transplantation model using a modified non-suture cuff technique

--Manuscript Draft--

Article Type:	Methods Article - Author Produced Video
Manuscript Number:	JoVE59983R2
Full Title:	Murine cervical aortic transplantation model using a modified non-suture cuff technique
Keywords:	Aortic transplantation Mouse model Chronic allograft vasculopathy Nonsuture Cuff technique Neointima formation Vascular smooth muscle cell Microsurgery.
Corresponding Author:	Michael Nikolaus Thomas, M.D. Klinikum der Universitat Munchen Klinik fürAllgemeineViszeral und Transplantationschirurgie Munich, Bavaria GERMANY
Corresponding Author's Institution:	Klinikum der Universitat Munchen Klinik fürAllgemeineViszeral und Transplantationschirurgie
Corresponding Author E-Mail:	michael.n.thomas@gmail.com
Order of Authors:	Martin Ryll Julian Bucher Moritz Drefs Florian Bösch K. Kumaraswami Tobias Schiergens Hanno Niess Markus Schoenberg Sven Jacob Markus Rentsch Markus Guba Jens Werner Joachim Andrassy Michael Nikolaus Thomas, M.D.
Additional Information:	
Question	Response
Please indicate whether this article will be Standard Access or Open Access.	Standard Access (US\$1200)

1 TITLE:

2 Murine Cervical Aortic Transplantation Model using a Modified Non-Suture Cuff Technique

4 AUTHORS AND AFFILIATIONS:

5 Martin Ryll¹, Jullian Bucher¹, Mortiz Drefs¹, Florian Bösch¹, K. Kumaraswami², Tobias
6 Schiergens¹, Hanno Niess¹, Markus Schoenberg¹, Sven Jacob¹, Markus Rentsch¹, Markus
7 Guba¹, Jens Werner¹, Joachim Andrassy¹, Michael N. Thomas^{1,3}

9 ¹Department of General, Visceral, and Transplant Surgery, Ludwig-Maximilians University
10 Munich

11 ²Walter-Brendel-Centre of Experimental Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität Munich

12 ³Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University Hospital of Cologne,
13 University of Cologne

15 Corresponding Author:

16 Michael N. Thomas (michael.thomas@uk-koeln.de)

18 Email Addresses of Co-Authors:

19 M. Ryll (martin-ryll@gmx.de)
20 J. Bucher (Julian.bucher@med.uni-muenchen.de)
21 M. Drefs (florian.boesch@med.uni-muenchen.de)
22 K. Kumaraswami (k.kumaraswami@med.uni-muenchen.de)
23 T. Schiergens (tobias.schiergens@med.uni-muenchen.de)
24 H. Niess (Hanno.Niess@med.uni-muenchen.de)
25 M. Schoenberg (Markus.Schoenberg@med.uni-muenchen.de)
26 S. Jacob (Sven.Jacob@med.uni-muenchen.de)
27 M. Rentsch (Markus.Rentsch@med.uni-muenchen.de)
28 M. Guba (Markus.Guba@med.uni-muenchen.de)
29 J. Werner (Jens.Werner@med.uni-muenchen.de)
30 J. Andrassy (Joachim.andrassy@med.uni-muenchen.de)
31 M. N. Thomas (michael.thomas@uk-koeln.de)

33 KEYWORDS:

34 Aortic transplantation, chronic allograft, vasculopathy, non-suture cuff technique, vascular
35 smooth muscle cell, microsurgery.

37 SUMMARY:

38 Here, we present a protocol of heterotopic aortic transplantation in mice using the non-
39 suture cuff technique in a cervical murine model. This model can be used to study the
40 underlying pathology of chronic allograft vasculopathy (CAV) and can help evaluate new
41 therapeutic agents in order to prevent its formation.

43 ABSTRACT:

44 With the introduction of powerful immunosuppressive protocols, distinct advances are
45 possible in the prevention and therapy of acute rejection episodes. However, only minor
46 improvement in the long-term results of transplanted solid organs could be observed over
47 the past decades. In this context, chronic allograft vasculopathy (CAV) still represents the
48 leading cause of late organ failure in cardiac, renal and pulmonary transplantation.

49
50 Thus far, the underlying pathogenesis of CAV development remains unclear, explaining why
51 effective treatment strategies are presently missing and emphasizing a need for relevant
52 experimental models in order to study the underlying pathophysiology leading to CAV
53 formation. The following protocol describes a murine heterotopic cervical aortic
54 transplantation model using a modified non-suture cuff technique. In this technique, a
55 segment of the thoracic aorta is interpositioned in the right common carotid artery. With the
56 use of the non-suture cuff technique, an easy to learn and reproducible model can be
57 established, minimizing the possible heterogeneity of sutured vascular micro anastomoses.
58

59 **INTRODUCTION:**

60 Over the past six decades, solid organ transplantation has evolved from an experimental
61 procedure to a standard of care for the treatment of end-stage organ failure¹. Due to the
62 improvement of antimicrobial agents, surgical techniques and advancement in
63 immunosuppressive regiments, the early success rate of solid organ transplantation have
64 significantly increased over the past decades².

65
66 However, long-term graft survival rates have not significantly improved in the same
67 manner³. The development of CAV is the major factor limiting long-term survival⁴⁻⁶. This
68 pathology is characterized by the formation of a concentric neointimal layer consisting of
69 smooth muscle cells, leading to progressive narrowing of the vessel and consecutive
70 malperfusion of the transplanted solid organ. In heart transplant recipients, CAV lesions can
71 be diagnosed in up to 75% of patients 3 years after transplantation⁷.

72
73 The pathophysiology of CAV is not fully understood yet. It seems to be related to numerous
74 immunological and non-immunological factors, leading to endothelial damage with
75 subsequent endothelial activation and dysfunction⁸. Thus far, no causal treatment option
76 exists for the prevention of CAV, emphasizing the need for a reproducible small animal
77 model in order to study the formation and potential therapy of CAV.

78
79 With the use of murine aortic transplantation models, CAV like lesions can be seen 4 weeks
80 after transplantation. Those lesions consist mainly of vascular smooth muscle cells, thereby,
81 resembling the human pathology. Because of a wide variety of transgenic and knock out
82 mice, the use of mouse models in transplant associated pathologies offers a unique
83 opportunity to identify new therapeutic options and understand their development. Due to
84 the small diameter of the transplanted vessels however, the use of mouse models is
85 commonly associated with long learning curves and an initial high complication rate⁹. With
86 the introduction of the non-suture cuff technique, this most challenging part of the
87 operation can be facilitated and the diameter of the anastomosis is kept constant^{10,11}.

88
89 **PROTOCOL:**

90
91 All experiments were performed according to the guidelines of the German animal welfare
92 act (TierSchG.) (AZ: 55.2-1-54-2532.Vet_02-80-2015).

93
94 **1. Animal housing**

95

96 1.1. For experiments, use male C57BL/6 and BALB/c mice weighing 20-25 g with C57BL/6
97 mice as the recipient animals and BALB/c mice as the donor animals.

98
99 1.2. Purchase the animals and house in a barrier pathogen-free facility, in accordance with
100 the FELASA guidelines for health monitoring¹².

101
102 1.3. Keep the mice in standard Makrolon cages with enrichment nesting material. Provide ad
103 libitum access to water and pelleted food at a day/night cycle of 12 h.

104
105 1.4. Maintain the room temperature at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and the relative humidity at $55 \pm 5\%$.

106
107 **2. Recipient preparation**

109 2.1. First, anesthetize the recipient animal (C57BL/6) with an intraperitoneal injection of
110 midazolam (5 mg/kg; 5 mg/mL), medetomidin (0.5 mg/kg; 1 mg/mL) and fentanyl (0.05
111 mg/kg; 0.05 mg/mL).

112
113 NOTE: The correct depth of the anesthesia should be reached in 5-10 min.

114
115 2.1.1. Pinch the hind feet with forceps to check for reflexes to confirm the depth of
116 anesthesia.

117
118 2.2. Clip all the hair of the cervical lateral region with an electric hair clipper for small
119 animals and apply ophthalmic ointment with cotton swabs to prevent the eyes from drying
120 out during the procedure.

121
122 2.3. Place the animal in a supine position on a heating pad under the microscope and gently
123 tape its legs to the operating table with skin sensitive plaster strips.

124
125 2.4. Tilt its head back and scrub the operative field several times with alcohol.

126
127 2.5. Make a skin incision from the jugular incision to the right lower mandible with small
128 scissors.

129
130 2.6. Remove the right lower lobe of the submandibular gland via bipolar cautery of the
131 vessel pedicle and subsequent excision with microscissors.

132
133 2.7. Remove the right sternocleidomastoid muscle via bipolar cautery of the upper and
134 lower portion and subsequent excision with microscissors to gain access to the common
135 carotid artery.

136
137 2.8. Mobilize the common carotid artery as far distally and proximally as possible by pulling
138 the surrounding connective tissue apart with fine forceps.

139
140 2.9. Tie two 7-0 silk ligatures with minimal distance between each around the middle of the
141 common carotid artery and transect the common carotid artery with fine microscissors
142 between the ligatures.

143

144 2.10. Pass the proximal, ligated end through the cuff and fix it with a small artery clamp.

145
146 NOTE: The cuffs that were used in this procedure were cut with microscissors from tubes of
147 polyimide with an outer diameter of 0.610 mm and a wall thickness of 0.0254 mm. The
148 completed cuffs had a length of ~2 mm with one half, which is used for the cuffing process,
149 being a full cylinder and the other half, which is clamped, being a half-cylinder.

150
151 2.11. Remove the ligature with fine microscissors, as close to the ligature as possible, and
152 flush the lumen with heparinized saline (50 IU/mL) with a 30 G needle, while taking care not
153 to damage the vessel walls.

154
155 2.12. Distend the open lumen using fine vascular dilatators and evert the carotid stump over
156 the cuff by pulling it gently over the polyimide tube.

157
158 2.13. Immediately fix the everted carotid with a loosely pre-tied 7-0 silk loop.

159
160 NOTE: Loosely pre-tie 4 7-0 silk loops with a diameter of about 1.5 mm before the surgery to
161 make the cuffing-procedure smoother and easier.

162
163 2.14. Perform the same procedure (2.10-2.13) at the other end of the carotid artery.

164
165 2.15. Set the recipient animal aside and moisturize the operative field with saline until the
166 aortic segment is explanted.

167
168 **3. Donor operation**

169
170 3.1. Anesthetize the donor mouse (BALB/c) in the same fashion as the recipient animal.

171
172 3.1.1. Pinch the hind feet with forceps to check for reflexes to confirm sufficient anesthesia.

173
174 3.2. Clip all hair of the abdominal and thoracic region with an electric hair clipper for small
175 animals and apply ophthalmic ointment with cotton swabs to prevent the eyes from drying
176 out during the procedure.

177
178 3.3. Place the animal in a supine position on a heating pad under the microscope and gently
179 tape its legs to the operating table with skin sensitive plaster strips.

180
181 3.4. Scrub the operative field several times with alcohol.

182
183 3.5. Perform a midline abdominal laparotomy with small scissors and push the intestines
184 slightly upward to expose the inferior vena cava (IVC).

185
186 3.6. Inject the inferior vena cava (IVC) with 1 mL of heparinized saline using a 30 G needle.

187
188 3.7. Cut the abdominal aorta and IVC below the renal arteries with small scissors to
189 exsanguinate the donor animal. Loosely place a compress into the abdomen to absorb the
190 blood.

191

- 192 3.8. Perform a thoracotomy at the bilateral diversion of the ribs with scissors and tilt the
193 anterior chest wall cranially with a surgical clamp to expose the mediastinum.
194
195 3.9. Cut the IVC and the esophagus directly above the diaphragm with microscissors.
196
197 3.10. Remove the heart and the lungs by tilting them upward with forceps holding the cut
198 IVC/esophagus and then excising them with microscissors from their base to gain access to
199 the thoracic aorta in the dorsal mediastinum.
200
201 3.11. Mobilize the thoracic aorta from its surrounding tissue by pulling apart the surrounding
202 connective tissue and fat with fine forceps while being careful not to damage any intercostal
203 arteries.
204
205 3.12. Cauterize all branches from the thoracic aorta with bipolar cautery forceps and excise
206 the aortic segment between the diaphragm and the aortic arch using microscissors.
207
208 3.13. Flush the excised aortic segment with heparinized saline with a 30 G needle, while
209 taking care not to damage the vessel walls, to remove any remaining blood or clots, and
210 transfer the graft to the recipient animal.

211
212 NOTE: Directly place the aortic graft in the roughly right position in the recipient during
213 transfer. If there are problems confusing the different ends of the graft in the recipient
214 animal, a loose ligature around the distal end could help.

215
216 **4. Implantation**

- 217
218 4.1. Pull the proximal end of the donor aortic segment over the proximal cuff on top of the
219 everted carotid artery with fine forceps and immediately fix it with a loosely pre-tied 7-0 silk
220 loop.
221
222 4.2. Trim the distal, free end of the aortic graft with microscissors so that the graft length fits
223 the distance between the two cuffs.
224
225 4.3. Repeat step 4.1 on the other end of the aorta with the other cuff to complete the
226 anastomosis.
227
228 4.4. Remove the distal clamp to allow retrograde perfusion.
229
230 4.5. After achieving hemostasis, remove the proximal clamp to complete the anastomosis.
231
232 4.6. Finally, close the wound with 6-0 continuous suture.

233
234 **5. Postoperative care**

- 235
236 5.1. Monitor the mouse closely in the first 6 h after the operation and then several times a
237 day for the first 72 h after the transplantation to detect any complications instantly.
238

239 5.2. For postoperative analgesia, inject the transplanted mouse with buprenorphine (0.05-
240 0.1 mg/kg) subcutaneously directly after the transplantation and then every 12 h for 72 h to
241 provide appropriate, long term analgesia.

242

243 **6. Aortic graft explanations**

244

245 6.1. Anesthetize the transplanted animal with an intraperitoneal injection of midazolam (5
246 mg/kg; 5 mg/mL), medetomidin (0.5 mg/kg; 1 mg/mL) and fentanyl (0.05 mg/kg; 0.05
247 mg/mL) 4 weeks after transplantation.

248 6.1.1. Pinch the hind feet with forceps to check for reflexes to confirm sufficient anesthesia.

249 6.2. Clip all hair of the abdominal, thoracic and cervical region with an electric hair clipper
250 for small animals.

251 6.3. Place the animal in a supine position on a heating pad under the microscope and gently
252 tape its legs to the operating table with skin sensitive plaster strips.

253 6.4. Scrub the operative field several times with alcohol.

254 6.5. Perform a midline abdominal laparotomy with small scissors and push the intestines
255 slightly upward to expose the inferior vena cava (IVC).

256 6.6. Inject the inferior vena cava (IVC) with 1 mL of heparinized saline using a 30 G needle.

257 6.7. Cut the abdominal aorta and IVC below the renal arteries with small scissors to
258 exsanguinate the donor animal. Loosely place a compress into the abdomen to absorb the
259 blood.

260 6.8. Make a skin incision from the jugular incision to the right lower mandible with small
261 scissors corresponding to the skin incision made during the transplant procedure.

262 6.9. Identify the transplanted aortic graft together with the distal and proximal cuff and
263 blunt remove any surrounding tissue with forceps.

264 6.10. Using microscissors, cut through the common carotid artery distal and proximal to the
265 aortic graft with the cuffs in order to explant the aortic graft together with the two cuff
266 ends.

267 6.11. Cut the aortic segment in half and preserve the specimens for further analyses (frozen
268 sections, paraffin embedded sections, snap frozen material)^{13,14}.

269

270 **REPRESENTATIVE RESULTS**

271

272 In the fully MHC-mismatch transplantation model, a concentric neointimal layer can be seen
273 4 weeks after transplantation (**Figure 2**). This layer consists primarily of vascular smooth
274 muscle cells as immunohistological staining for SM22 (a selective marker for mature vascular
275 smooth muscle cells) revealed. As stated before, these vascular smooth muscle cells are
276 pathognomonic for lesions seen in chronic allograft vasculopathy. For further analyses,

287 aortic segments should be sectioned and stained by Elastica van Gieson-staining. Here, the
288 neointimal layer can easily be differentiated to the elastic fibers of the internal elastic
289 membrane, dividing the *Tunica intima* from the *Tunica media*.

290
291 In order to evaluate a potential therapeutic effect in this model, the neointima-media ratio,
292 as well as the luminal cross-sectional area narrowing, can be measured in those sectioned
293 samples^{13,15}. In our described modified model of non-suture aortic transplantation, a
294 technical success rate of >91% could be achieved in over 300 aortic transplantations
295 performed. This high success rate could be accomplished by using a cuff made from
296 polyimide tubing with an outer diameter of 0.610 mm and a wall thickness of 0.0254 mm.
297

298 **FIGURE LEGENDS:**

299 **Figure 1: Intraoperative pictures.** (A) Cutting the ligated carotid artery. (B) Clamped carotid
300 end after removing the ligature and flushing the end with heparinized saline. (C) Cuffing
301 procedure. (D) Completed recipient preparation (both carotids end cuffed). (E) Transplanted
302 aortic segment before and (F) after reperfusion.

303
304 **Figure 2: Histological specimen of transplanted aortic segments 4 weeks after**
305 **transplantation.** (A) Representative immunohistological staining with SM22 (green
306 fluorescence) and DAPI (blue fluorescence) showing the thick neointimal layer consisting of
307 vascular smooth muscle cells. The elastic fibers are shown in red fluorescence (20x
308 magnification). (B) Elastica-van-Gieson staining (10x magnification). (C) Syngeneic
309 transplanted aortic segment 4 weeks after transplantation (10x magnification).

310
311 **DISCUSSION:**

312 Chronic allograft vasculopathy is the major cause of late graft loss after solid organ
313 transplantation of the heart and likely renal and lung allografts⁸. Thus far, no causal
314 therapeutic regimen could be developed in order to prevent the formation of CAV.
315 The pathophysiology of CAV is multifactorial and involves immunological and non-
316 immunological aspects¹⁶. The use of rodent models in transplantation have been essential in
317 understanding the underlying pathophysiology of allograft rejection processes in solid organ
318 transplantation and helped to identify novel therapeutic approaches that prevent
319 rejection¹⁷. CAV is characterized by the formation of a neointimal layer consisting of vascular
320 smooth muscle cells leading to consecutive narrowing of the vessel and malperfusion of the
321 transplanted organ with subsequent deterioration of organ function⁷.

322
323 In the described murine aortic transplantation model, the concentric neointimal formation
324 can be observed in fully MHC (H-2^d to H-2^b) mismatch thoracic aortic grafts 4 weeks after
325 transplantation. Those lesions primarily consist of vascular smooth muscle cells (**Figure 2**).
326 Shi et al. described the first mouse model of transplant arteriosclerosis in 1994¹⁸. They
327 grafted a carotid artery segment to the carotid artery by end to side suturing. In 1996,
328 Koulack et al. established the first abdominal mouse aortic transplantation model by grafting
329 an aortic segment to the infrarenal aorta by end-to-end anastomosis¹⁹. Dietrich et al. first
330 described the use of a non-suture cuff technique for the transplantation of a thoracic aortic
331 segment to the carotid artery in 2000¹¹.

332
333 In comparison to mouse models using microvascular anastomosis to transplant aortic
334 segments, the cuff technique offers several benefits. First, the procedure is simpler and

335 easier to learn. Second, the ischemic time of the grafted aortic segment is constant, since
336 the recipient animal is prepared first for the anastomosis before the procurement of the
337 aortic segment of the donor is performed, minimizing cold and warm ischemia time. Third,
338 the diameter of the anastomosis is kept constant due to the rigid character of the polyimide
339 cuff. Thus, strictures of the anastomotic region can be neglected.

340
341 Furthermore, the surgical procedure is less traumatic for the recipient animal as compared
342 to the technique with the abdominal incision. In addition, the implementation of the cuff
343 technique offers the possibility of various different types of solid organ transplantation while
344 using the same technique in the recipient animal^{11,20,21}.

345
346 Even though we are convinced that this microsurgical technique is easier to learn than other
347 aortic transplant models described in the literature there are some possible pitfalls during
348 the procedure. During the recipient operation, be sure to properly cauterize the
349 sternocleidomastoid muscle before cutting it. The muscle is well vascularized and severe
350 bleeding can occur if the accompanying vessels are not thoroughly coagulated. These
351 bleedings are hard to control as the muscle will retract once fully dissected. In addition,
352 while mobilizing the common carotid artery be sure not to directly grab the artery itself.

353
354 The cuff procedure itself is the most challenging part of the operation by far and most
355 susceptible to failure. It is, therefore, vital to work with the right length of the carotid artery.
356 In the beginning, surgeons tend to prepare too little length of the carotid artery, which
357 makes the procedure a lot harder to complete. Moreover, in the beginning, surgeons tend to
358 set the dividing ligature around the common carotid artery right in the middle of the
359 operating field. This can lead to difficulties while performing the more cranial located cuff as
360 this carotid end segment is quite rigid and difficult to mobilize. Meanwhile, a significant
361 portion of the common carotid artery can be mobilized by slight tension from the area below
362 the clavicle. Therefore, we suggest ligating the carotid artery slightly more proximally to
363 leave more length to the cranial part of the common carotid artery. Once the common
364 carotid artery is dissected and the ends are passed through the cuffs and fixed with the
365 vascular clamps, dilatation of the carotid artery must be performed. In this part of the
366 operation, it is very important not to overstretch the vessel as this may damage the vessel
367 wall, leading to failure during the cuffing procedure. Rotating the whole operative field so
368 that the traction is in line with the alignment of the arterial clamp on the cuff facilitates the
369 procedure.

370
371 While procuring the aortic segment, be sure not to rip out any intercostal arteries or other
372 branches of the thoracic aorta. On the other hand, take care not to cauterize too close to the
373 thoracic aorta in order to prevent damage of the graft with increased risk of thrombosis of
374 the graft after transplantation.

375
376 While implanting the aortic segment, be sure that both ends are properly aligned in order to
377 prevent torsion of the graft. In addition, the aortic segment should be shortened to the
378 correct length to prevent kinking during reperfusion. When reperfusing the graft, be sure to
379 always open the more cranial clamp first to observe hemostasis. Small hemorrhages of not
380 completely coagulated intercostal arteries can be controlled by applying gentle pressure
381 with a small cotton swab.

382

383 The whole transplantation should take less than an hour with maximum of 30 minutes for
384 the recipient preparation and maximum of 15 minutes each for the donor operation and
385 implantation.
386
387 The most discussed disadvantage of this method is that the cuff will persist in the
388 anastomosis during the length of the experiment. This could lead to a certain foreign body
389 reaction and a possible higher risk of thrombosis. However, histopathological analyses of
390 specimens transplanted with the cuff technique revealed only mild foreign body reaction of
391 the graft and the tubing²². Another discussed limitation of the procedure is the heterotopic
392 placement of the thoracic aorta into the common carotid artery. Due to the differing vessel
393 diameters between the thoracic aorta and the common carotid artery, one could expect a
394 more turbulent flow in the transplanted aortic segment in comparison to an orthotopic
395 aortic interpositioning. This could lead to methodical based intimal changes. However,
396 syngeneic transplanted segments revealed only little neointima formation ruling out a
397 methodical based bias (see **Figure 2**).
398

399 This paper aims to facilitate the implementation of this model by other researchers in their
400 laboratories. With the above-mentioned modifications, this mouse model of aortic
401 transplantation can be accomplished with basic microsurgical skills, while achieving a high
402 success rate.

403

404 **ACKNOWLEDGMENTS:**

405 None

406

407 **DISCLOSURES:**

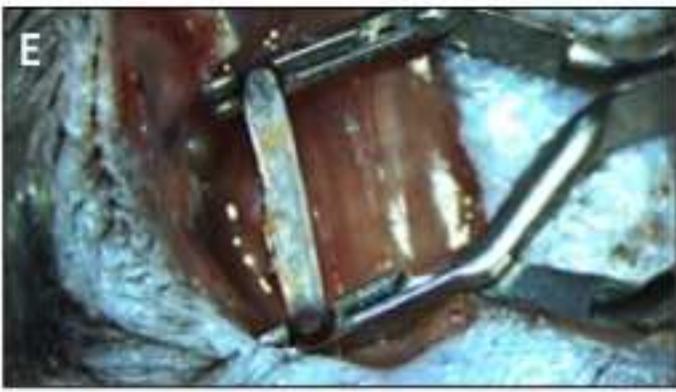
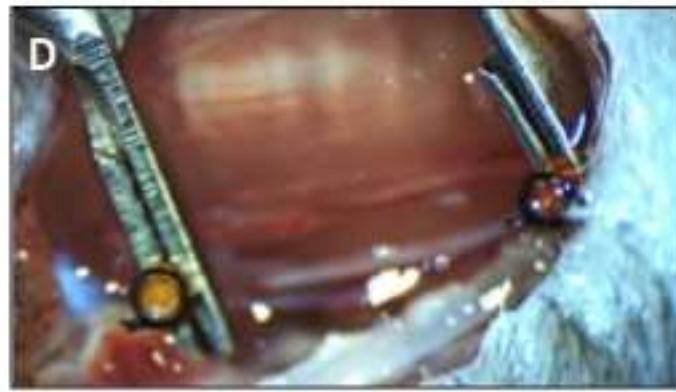
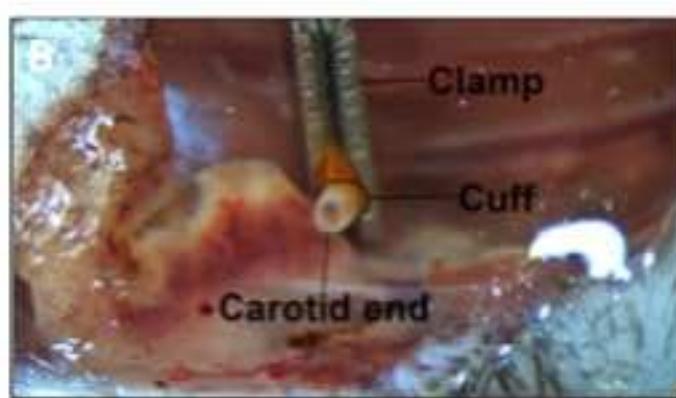
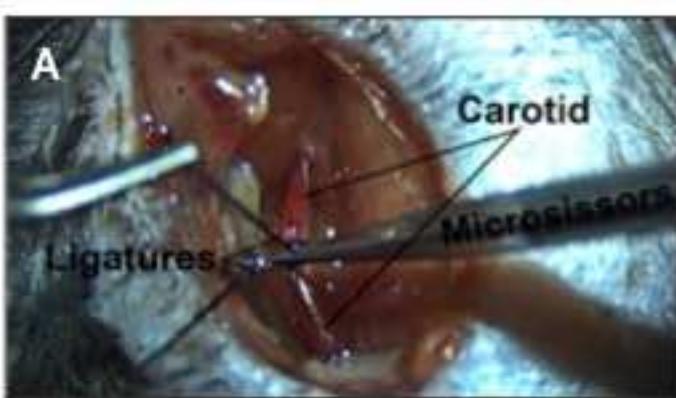
408 The authors declare that they have no competing financial interests.

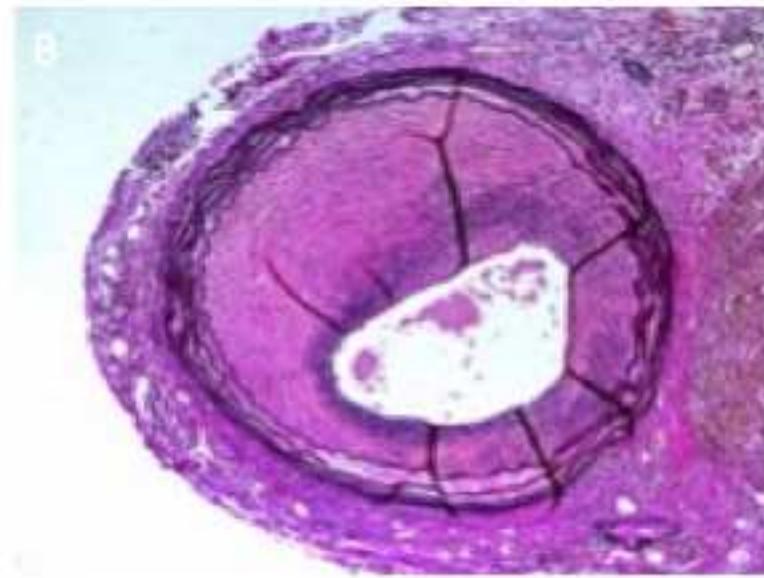
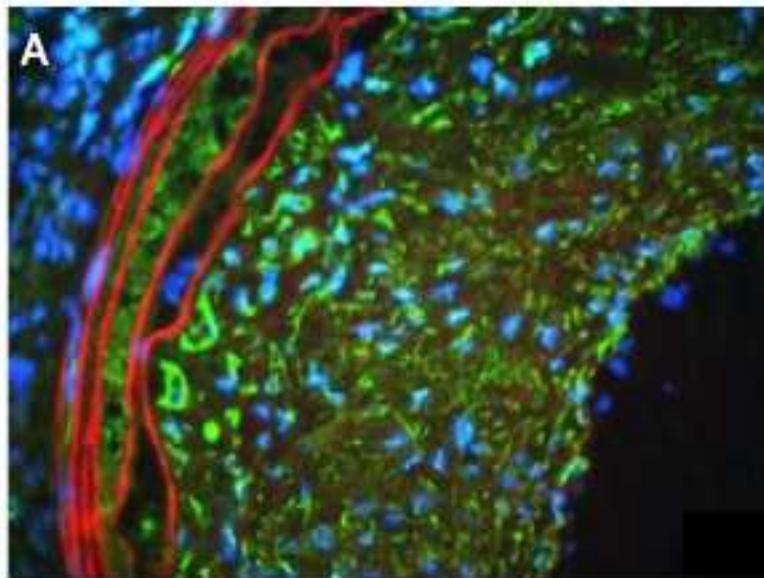
409

410 **REFERENCES:**

- 411 1 Rana, A. et al. Survival benefit of solid-organ transplant in the United States. *JAMA*
412 *Surgeery*. **150** (3), 252-259 (2015).
- 413 2 Rana, A., Godfrey, E. L. Outcomes in Solid-Organ Transplantation: Success and
414 Stagnation. *Texas Heart Institute Journal*. **46** (1), 75-76 (2019).
- 415 3 Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R., Kaplan, B. Lack of improvement in
416 renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most
417 recent era. *American Journal of Transplantation*. **4** (3), 378-383 (2004).
- 418 4 Bagnasco, S. M., Kraus, E. S. Intimal arteritis in renal allografts: new takes on an old
419 lesion. *Current Opinion in Organ Transplantation*. **20** (3), 343-347 (2015).
- 420 5 Hollis, I. B., Reed, B. N., Moranville, M. P. Medication management of cardiac
421 allograft vasculopathy after heart transplantation. *Pharmacotherapy*. **35** (5), 489-501 (2015).
- 422 6 Verleden, G. M., Raghu, G., Meyer, K. C., Glanville, A. R., Corris, P. A new classification
423 system for chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.
424 **33** (2), 127-133 (2014).
- 425 7 Ramzy, D. et al. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Canadian Journal of Surgery*.
426 **48** (4), 319-327 (2005).
- 427 8 Skoric, B. et al. Cardiac allograft vasculopathy: diagnosis, therapy, and prognosis.
428 *Croatian Medical Journal*. **55** (6), 562-576 (2014).
- 429 9 Koulack, J. et al. Development of a mouse aortic transplant model of chronic
430 rejection. *Microsurgery*. **16** (2), 110-113 (1995).

- 431 10 Rowinska, Z. et al. Using the Sleeve Technique in a Mouse Model of Aortic
432 Transplantation - An Instructional Video. *Journal of Visualized Experiment.* (128) (2017).
- 433 11 Dietrich, H. et al. Mouse model of transplant arteriosclerosis: role of intercellular
434 adhesion molecule-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **20** (2), 343-352
435 (2000).
- 436 12 Mahler (Convenor), M. et al. FELASA recommendations for the health monitoring of
437 mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units.
438 *Laboratory Animals.* **48** (3), 178-192 (2014).
- 439 13 Ollinger, R. et al. Blockade of p38 MAPK inhibits chronic allograft vasculopathy.
440 *Transplantation.* **85** (2), 293-297 (2008).
- 441 14 Thomas, M. N. et al. SDF-1/CXCR4/CXCR7 is pivotal for vascular smooth muscle cell
442 proliferation and chronic allograft vasculopathy. *Transplant International.* **28** (12), 1426-
443 1435 (2015).
- 444 15 Ollinger, R. et al. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell
445 proliferation. *Circulation.* **112** (7), 1030-1039 (2005).
- 446 16 Segura, A. M., Buja, L. M. Cardiac allograft vasculopathy: a complex multifactorial
447 sequela of heart transplantation. *Texas Heart Institute Journal.* **40** (4), 400-402 (2013).
- 448 17 McDaid, J., Scott, C. J., Kissenpfennig, A., Chen, H., Martins, P. N. The utility of animal
449 models in developing immunosuppressive agents. *European Journal of Pharmacology.* **759**,
450 295-302 (2015).
- 451 18 Shi, C., Russell, M. E., Bianchi, C., Newell, J. B., Haber, E. Murine model of accelerated
452 transplant arteriosclerosis. *Circulation Research.* **75** (2), 199-207 (1994).
- 453 19 Koulack, J. et al. Importance of minor histocompatibility antigens in the development
454 of allograft arteriosclerosis. *Clinical Immunology and Immunopathology.* **80** (3 Pt 1), 273-277
455 (1996).
- 456 20 Maglione, M. et al. A novel technique for heterotopic vascularized pancreas
457 transplantation in mice to assess ischemia reperfusion injury and graft pancreatitis. *Surgery.*
458 **141** (5), 682-689 (2007).
- 459 21 Oberhuber, R. et al. Murine cervical heart transplantation model using a modified
460 cuff technique. *Journal of Visualized Experiment.* 10.3791/50753 (92), e50753 (2014).
- 461 22 Nakao, A., Ogino, Y., Tahara, K., Uchida, H., Kobayashi, E. Orthotopic intestinal
462 transplantation using the cuff method in rats: a histopathological evaluation of the
463 anastomosis. *Microsurgery.* **21** (1), 12-15 (2001).
- 464





Name of Material/Equipment	Company	Catalog Number	Comments/Description
Balb-c Mice (H2-d)	Charles River	Strain# 028	Donor animal
Bipolar cautery system	ERBE	ICC 50 / 20195-023	Bipolar cautery
C57BL/6J (H-2b)	Charles River	Strain# 027	Recipient animal
Halsey Needle Holders	FST	12501-12	Needle Holder
Halsted-Mosquito Forceps	AESCULAP	BH111R	Curved Clamp
Medical Polyimide Tubing	Nordson MEDICAL	141-0031	Cuff-Material
Micro Serrefines	FST	18055-04	Micro Vessel Clip
Micro-Adson Forceps (serrated)	FST	11018-12	Standard Forceps
Micro-Serrefine Clamp Applying Forceps	FST	18057-14	Clipapplicator
S&T Forceps - SuperGrip Tips (Angled 45°)	S&T	00649-11	Fine Forceps
S&T Vessel Dilating Forceps - Angled 10° (Tip diameter 0.2 mm)	S&T	00125-11	Vesseldilatator
Schott VisiLED Set	Schott	MC 1500 / S80-55	Light
Stereoscopic microscope	ZEISS	SteREO Discovery.V8	Microscope
Student Fine Scissors / Surgical Scissors - Sharp-Blunt	FST	91460-11 / 14001-12	Standard Sissors
Vannas-Tübingen Spring Scissors (curved, 8.5 cm)	FST	15004-08	Microscissors (curved)
Vannas-Tübingen Spring Scissors (straight, 8.5 cm)	FST	15003-08	Microscissors (straight)



1 Alewife Center #200
Cambridge, MA 02140
tel. 617.945.9051
www.jove.com

ARTICLE AND VIDEO LICENSE AGREEMENT

Title of Article:

MURINE CERVICAL AORTIC TRANSPLANTATION MODEL USING A MODIFIED NONSUTURE - CUFF TECHNIQUE

Author(s):

M. RYLL, J. BUCHER, F. BÖSCH, K. KUMARASWAMI, T. SCHIERSCHEN,
H. NIESS, M. SCHOENBERG, M. DENTSCH, M. GUBA, J. WERNER, J. ANDRASSY, M. THOMAS

Item 1: The Author elects to have the Materials be made available (as described at <http://www.jove.com/publish>) via:

Standard Access

Open Access

Item 2: Please select one of the following items:

- The Author is NOT a United States government employee.
- The Author is a United States government employee and the Materials were prepared in the course of his or her duties as a United States government employee.
- The Author is a United States government employee but the Materials were NOT prepared in the course of his or her duties as a United States government employee.

ARTICLE AND VIDEO LICENSE AGREEMENT

1. **Defined Terms.** As used in this Article and Video License Agreement, the following terms shall have the following meanings: "Agreement" means this Article and Video License Agreement; "Article" means the article specified on the last page of this Agreement, including any associated materials such as texts, figures, tables, artwork, abstracts, or summaries contained therein; "Author" means the author who is a signatory to this Agreement; "Collective Work" means a work, such as a periodical issue, anthology or encyclopedia, in which the Materials in their entirety in unmodified form, along with a number of other contributions, constituting separate and independent works in themselves, are assembled into a collective whole; "CRC License" means the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivs 3.0 Unported Agreement, the terms and conditions of which can be found at: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/legalcode>; "Derivative Work" means a work based upon the Materials or upon the Materials and other pre-existing works, such as a translation, musical arrangement, dramatization, fictionalization, motion picture version, sound recording, art reproduction, abridgment, condensation, or any other form in which the Materials may be recast, transformed, or adapted; "Institution" means the institution, listed on the last page of this Agreement, by which the Author was employed at the time of the creation of the Materials; "JoVE" means MyJoVE Corporation, a Massachusetts corporation and the publisher of The Journal of Visualized Experiments; "Materials" means the Article and / or the Video; "Parties" means the Author and JoVE; "Video" means any video(s) made by the Author, alone or in conjunction with any other parties, or by JoVE or its affiliates or agents, individually or in collaboration with the Author or any other parties, incorporating all or any portion

of the Article, and in which the Author may or may not appear.

2. **Background.** The Author, who is the author of the Article, in order to ensure the dissemination and protection of the Article, desires to have the JoVE publish the Article and create and transmit videos based on the Article. In furtherance of such goals, the Parties desire to memorialize in this Agreement the respective rights of each Party in and to the Article and the Video.

3. **Grant of Rights in Article.** In consideration of JoVE agreeing to publish the Article, the Author hereby grants to JoVE, subject to Sections 4 and 7 below, the exclusive, royalty-free, perpetual (for the full term of copyright in the Article, including any extensions thereto) license (a) to publish, reproduce, distribute, display and store the Article in all forms, formats and media whether now known or hereafter developed (including without limitation in print, digital and electronic form) throughout the world, (b) to translate the Article into other languages, create adaptations, summaries or extracts of the Article or other Derivative Works (including, without limitation, the Video) or Collective Works based on all or any portion of the Article and exercise all of the rights set forth in (a) above in such translations, adaptations, summaries, extracts, Derivative Works or Collective Works and (c) to license others to do any or all of the above. The foregoing rights may be exercised in all media and formats, whether now known or hereafter devised, and include the right to make such modifications as are technically necessary to exercise the rights in other media and formats. If the "Open Access" box has been checked in Item 1 above, JoVE and the Author hereby grant to the public all such rights in the Article as provided in, but subject to all limitations and requirements set forth in, the CRC License.

ARTICLE AND VIDEO LICENSE AGREEMENT

4. Retention of Rights in Article. Notwithstanding the exclusive license granted to JoVE in **Section 3** above, the Author shall, with respect to the Article, retain the non-exclusive right to use all or part of the Article for the non-commercial purpose of giving lectures, presentations or teaching classes, and to post a copy of the Article on the Institution's website or the Author's personal website, in each case provided that a link to the Article on the JoVE website is provided and notice of JoVE's copyright in the Article is included. All non-copyright intellectual property rights in and to the Article, such as patent rights, shall remain with the Author.

5. Grant of Rights in Video – Standard Access. This **Section 5** applies if the "Standard Access" box has been checked in **Item 1** above or if no box has been checked in **Item 1** above. In consideration of JoVE agreeing to produce, display or otherwise assist with the Video, the Author hereby acknowledges and agrees that, Subject to **Section 7** below, JoVE is and shall be the sole and exclusive owner of all rights of any nature, including, without limitation, all copyrights, in and to the Video. To the extent that, by law, the Author is deemed, now or at any time in the future, to have any rights of any nature in or to the Video, the Author hereby disclaims all such rights and transfers all such rights to JoVE.

6. Grant of Rights in Video – Open Access. This **Section 6** applies only if the "Open Access" box has been checked in **Item 1** above. In consideration of JoVE agreeing to produce, display or otherwise assist with the Video, the Author hereby grants to JoVE, subject to **Section 7** below, the exclusive, royalty-free, perpetual (for the full term of copyright in the Article, including any extensions thereto) license (a) to publish, reproduce, distribute, display and store the Video in all forms, formats and media whether now known or hereafter developed (including without limitation in print, digital and electronic form) throughout the world, (b) to translate the Video into other languages, create adaptations, summaries or extracts of the Video or other Derivative Works or Collective Works based on all or any portion of the Video and exercise all of the rights set forth in (a) above in such translations, adaptations, summaries, extracts, Derivative Works or Collective Works and (c) to license others to do any or all of the above. The foregoing rights may be exercised in all media and formats, whether now known or hereafter devised, and include the right to make such modifications as are technically necessary to exercise the rights in other media and formats. For any Video to which this **Section 6** is applicable, JoVE and the Author hereby grant to the public all such rights in the Video as provided in, but subject to all limitations and requirements set forth in, the CRC License.

7. Government Employees. If the Author is a United States government employee and the Article was prepared in the course of his or her duties as a United States government employee, as indicated in **Item 2** above, and any of the licenses or grants granted by the Author hereunder exceed the scope of the 17 U.S.C. 403, then the rights granted hereunder shall be limited to the maximum

rights permitted under such statute. In such case, all provisions contained herein that are not in conflict with such statute shall remain in full force and effect, and all provisions contained herein that do so conflict shall be deemed to be amended so as to provide to JoVE the maximum rights permissible within such statute.

8. Protection of the Work. The Author(s) authorize JoVE to take steps in the Author(s) name and on their behalf if JoVE believes some third party could be infringing or might infringe the copyright of either the Author's Article and/or Video.

9. Likeness, Privacy, Personality. The Author hereby grants JoVE the right to use the Author's name, voice, likeness, picture, photograph, image, biography and performance in any way, commercial or otherwise, in connection with the Materials and the sale, promotion and distribution thereof. The Author hereby waives any and all rights he or she may have, relating to his or her appearance in the Video or otherwise relating to the Materials, under all applicable privacy, likeness, personality or similar laws.

10. Author Warranties. The Author represents and warrants that the Article is original, that it has not been published, that the copyright interest is owned by the Author (or, if more than one author is listed at the beginning of this Agreement, by such authors collectively) and has not been assigned, licensed, or otherwise transferred to any other party. The Author represents and warrants that the author(s) listed at the top of this Agreement are the only authors of the Materials. If more than one author is listed at the top of this Agreement and if any such author has not entered into a separate Article and Video License Agreement with JoVE relating to the Materials, the Author represents and warrants that the Author has been authorized by each of the other such authors to execute this Agreement on his or her behalf and to bind him or her with respect to the terms of this Agreement as if each of them had been a party hereto as an Author. The Author warrants that the use, reproduction, distribution, public or private performance or display, and/or modification of all or any portion of the Materials does not and will not violate, infringe and/or misappropriate the patent, trademark, intellectual property or other rights of any third party. The Author represents and warrants that it has and will continue to comply with all government, institutional and other regulations, including, without limitation all institutional, laboratory, hospital, ethical, human and animal treatment, privacy, and all other rules, regulations, laws, procedures or guidelines, applicable to the Materials, and that all research involving human and animal subjects has been approved by the Author's relevant institutional review board.

11. JoVE Discretion. If the Author requests the assistance of JoVE in producing the Video in the Author's facility, the Author shall ensure that the presence of JoVE employees, agents or independent contractors is in accordance with the relevant regulations of the Author's institution. If more than one author is listed at the beginning of this Agreement, JoVE may, in its sole

ARTICLE AND VIDEO LICENSE AGREEMENT

discretion, elect not take any action with respect to the Article until such time as it has received complete, executed Article and Video License Agreements from each such author. JoVE reserves the right, in its absolute and sole discretion and without giving any reason therefore, to accept or decline any work submitted to JoVE. JoVE and its employees, agents and independent contractors shall have full, unfettered access to the facilities of the Author or of the Author's institution as necessary to make the Video, whether actually published or not. JoVE has sole discretion as to the method of making and publishing the Materials, including, without limitation, to all decisions regarding editing, lighting, filming, timing of publication, if any, length, quality, content and the like.

12. Indemnification. The Author agrees to indemnify JoVE and/or its successors and assigns from and against any and all claims, costs, and expenses, including attorney's fees, arising out of any breach of any warranty or other representations contained herein. The Author further agrees to indemnify and hold harmless JoVE from and against any and all claims, costs, and expenses, including attorney's fees, resulting from the breach by the Author of any representation or warranty contained herein or from allegations or instances of violation of intellectual property rights, damage to the Author's or the Author's institution's facilities, fraud, libel, defamation, research, equipment, experiments, property damage, personal injury, violations of institutional, laboratory, hospital, ethical, human and animal treatment, privacy or other rules, regulations, laws, procedures or guidelines, liabilities and other losses or damages related in any way to the submission of work to JoVE, making of videos by JoVE, or publication in JoVE or elsewhere by JoVE. The Author shall be responsible for, and shall hold JoVE harmless from, damages caused by lack of sterilization, lack of cleanliness or by contamination due to

the making of a video by JoVE its employees, agents or independent contractors. All sterilization, cleanliness or decontamination procedures shall be solely the responsibility of the Author and shall be undertaken at the Author's expense. All indemnifications provided herein shall include JoVE's attorney's fees and costs related to said losses or damages. Such indemnification and holding harmless shall include such losses or damages incurred by, or in connection with, acts or omissions of JoVE, its employees, agents or independent contractors.

13. Fees. To cover the cost incurred for publication, JoVE must receive payment before production and publication of the Materials. Payment is due in 21 days of invoice. Should the Materials not be published due to an editorial or production decision, these funds will be returned to the Author. Withdrawal by the Author of any submitted Materials after final peer review approval will result in a US\$1,200 fee to cover pre-production expenses incurred by JoVE. If payment is not received by the completion of filming, production and publication of the Materials will be suspended until payment is received.

14. Transfer, Governing Law. This Agreement may be assigned by JoVE and shall inure to the benefits of any of JoVE's successors and assignees. This Agreement shall be governed and construed by the internal laws of the Commonwealth of Massachusetts without giving effect to any conflict of law provision thereunder. This Agreement may be executed in counterparts, each of which shall be deemed an original, but all of which together shall be deemed to be one and the same agreement. A signed copy of this Agreement delivered by facsimile, e-mail or other means of electronic transmission shall be deemed to have the same legal effect as delivery of an original signed copy of this Agreement.

A signed copy of this document must be sent with all new submissions. Only one Agreement is required per submission.

CORRESPONDING AUTHOR

Name:

DR. MICHAEL N. THOMAS

Department:

UNIVERSITÄTS KLINIKUM GROSSHÄDERN

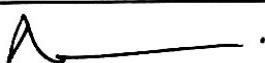
Institution:

KLINIK FÜR ANT

Title:

PD. DR.

Signature:



Date:

11.03.2019

Please submit a signed and dated copy of this license by one of the following three methods:

1. Upload an electronic version on the JoVE submission site
2. Fax the document to +1.866.381.2236
3. Mail the document to JoVE / Attn: JoVE Editorial / 1 Alewife Center #200 / Cambridge, MA 02140



KLINIK FÜR ALLGEMEINE, VISZERAL-
TRANSPLANTATIONS-, GEFÄß- UND
THORAXCHIRURGIE



Klinikum der Universität München · Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Transplantations-,
Gefäß- und Thoraxchirurgie · Marchioninistr. 15 · 81377 München

Vineeta Bajaj, Ph.D.
Review Editor
JoVE

Dr. med. Michael Thomas

Telefon +49 (0)89 4400-0
Telefax +49 (0)89 4400 - 75665
Michael.Thomas@med.uni-muenchen.de
www.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Marchioninistr. 15
D-81377 München

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

June 23rd, 2019

Dear Mr. Bajaj.

Thank you very much for your e-mail dated June 12th 2019, in which you informed us that our manuscript ID JoVE59983 entitled "***Murine cervical aortic transplantation model using a modified nonsuture-cuff technique***" has been editorially reviewed. Besides the items we discussed in the latest e-mail exchange, we addressed all comments in the manuscript and adapted the video.

In addition, we attached the letter from our local animal care committee stating that the skin preparation with alcohol has been approved (see pages 11/25 and 12/25 of our animal test request).

We hope that the revised manuscript will find acceptance of the reviewers and the editorial board.

Yours sincerely,

Dr. Michael Thomas

- Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes¹**

- Anzeige von Tierversuchen an Wirbeltieren, Kopffüßern oder Zehnfußkrebsen**

Von der Genehmigungsbehörde auszufüllen!
Geschäftszeichen

Antragsteller:
PD Dr. med. Joachim Andrassy

Telefon: 089/440072656	Telefax: 089/440075655	E-Mail: joachim.andrassy@med.uni-muenchen.de
---------------------------	---------------------------	---

Verantwortliche Leiterin/verantwortlicher Leiter des Vorhabens:

PD Dr. med. Joachim Andrassy

Dienstliche Anschrift (Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Klinikum Grosshadern, Chirurgie, LMU, München Marchioninstr. 15, 81377 München

Telefon: 089/440072657	Telefax:	E-Mail:
---------------------------	----------	---------

Stellvertretende Leiterin/stellvertretender Leiter des Vorhabens:

Dr. Michael Thomas

Dienstliche Anschrift (Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Klinikum Grosshadern, Chirurgie, LMU, München Marchioninstr. 15, 81377 München

Telefon: 089/440072657	Telefax:	E-Mail: michael.thomas@med.uni-muenchen.de
---------------------------	----------	---

Anlagen:

1. Projektzusammenfassung (§ 31 Abs. 2 i. V. m. § 41 Abs. 1 TierSchVersV; nicht erforderlich bei Anzeigen; die Zusammenfassung ist mit dem Formular des BfR außerdem in elektronischer Form vorzulegen
http://www.bfr.bund.de/de/nichttechnische_projektzusammenfassung_fuer_tierversuchsvorhaben-187738.html);
2. Glossar der im Text verwendeten Abkürzungen und ggf. spezifischen Fachausdrücke
3. Liste der Literaturzitate (falls nicht im Text eingearbeitet) (s. Punkt 1.1.2)
4. ggf. Formblatt „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ (s. Punkt 1.1.5.1)
5. ggf. Formblatt „Wiederholte Verwendung von Primaten“
6. Belastungstabelle (s. Punkt 1.2.9)
7. Score Sheet (s. Punkt 1.2.10)
8. Aufzeichnungsmuster nach § 9 Abs. 5 TierSchG (s. Punkt 1.2.11)
9. ggf. Personenbögen
10. ggf. Formblätter „Angaben zur Biometrischen Planung“
11. Statistisches Gutachten vorhanden nicht vorhanden
12. Sonstige:

¹ Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das Tierschutzgesetz (TierSchG) bzw. die Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) in der jeweils geltenden Fassung

1. Angaben zum Versuchsvorhaben

Bezeichnung des Versuchsvorhabens **A)**

Rolle des Cathepsin S für die Alloimmunität nach Aorta-, Herz- und Nierentransplantation

Kurzbezeichnung:

Cathepsin S Blockade unterdrückt die spezifische Immunantwort

Im Falle von Anzeigen: Rechtsgrundlage des Anzeigeverfahrens

- § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TierSchG Organ-/Gewebsentnahme zu anderen als wissenschaftlichen Zwecken
- Nicht genehmigungspflichtige Tierversuche – in Verbindung mit:
 - § 8a Abs. 1 Nr. 1 TierSchG; gesetzlich vorgeschrieben
 - § 8a Abs. 1 Nr. 2 TierSchG; diagnostische Maßnahmen /Chargenprüfungen etc.
 - § 8a Abs. 3 TierSchG Versuche an Zehnfußkrebsen
- § 8a Abs. 1 Nr. 3a TierSchG; Eingriffe und Behandlungen zur Gewinnung/Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen
- § 8a Abs. 1 Nr. 3b TierSchG; Organ-/Gewebsentnahme zu wissenschaftlichen /diagnostischen Zwecken
- § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG; Eingriffe und Behandlungen zur Aus- Fort und Weiterbildung

Im Falle von § 8a Abs. 1 Nr. 1 TierSchG: Rechtsgrundlage der Genehmigungsfreiheit:

1.1 Angaben zum wissenschaftlichen Hintergrund

1.1.1 Angabe des Zwecks des Versuchsvorhabens und wissenschaftlich begründete Darlegung, dass dieser einem in § 7a Abs. 1 TierSchG genannten Zwecke zuzuordnen ist.

Die Untersuchungen sind unerlässlich zum / zur:

- Grundlagenforschung
- Vorbeugen, Erkennen oder Behandeln von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperlichen Beschwerden
- Erkennen oder Beeinflussen physiologischer Zustände oder Funktionen bei Mensch und Tier.
- Förderung des Wohlergehens von Tieren oder Verbesserung der Haltungsbedingungen von Landwirtschaftlichen Nutztieren
- Erkennung von Umweltgefährdungen
- Entwicklung und Herstellung sowie Prüfung von Arzneimitteln, Lebensmitteln, Futtermitteln oder anderen Stoffen oder Produkten
- Prüfung von Stoffen oder Produkten auf ihre Wirksamkeit gegen Schädlinge
- Artenschutz
- Aus-, Fort- oder Weiterbildung
- Gerichtsmedizinische Untersuchungen

Erläuterungen:

Nach Jahrzehnten intensiver Forschung und dadurch bedingten Verbesserungen auf dem Gebiet der Immunsuppression sowie der Verbesserung chirurgischer Techniken, kann man die Transplantation solider Organe heutzutage als klinische Routine ansehen.

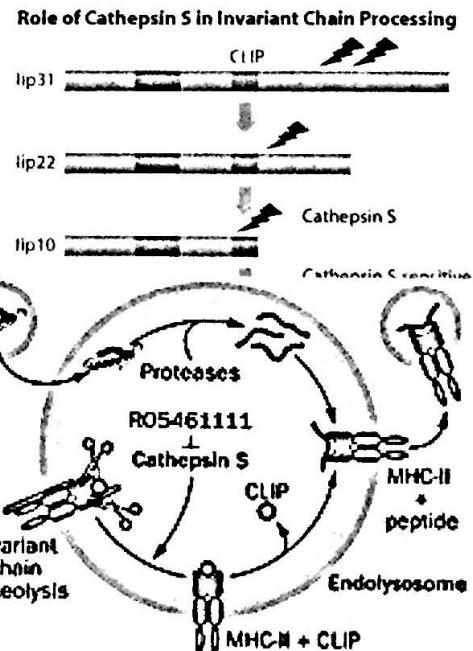
Trotz deutlicher Verbesserungen der kurzzeitigen Resultate nach Transplantation, konnte das Langzeitüberleben transplantiertener Organe in den letzten Jahren nicht signifikant verbessert werden (1). In den USA konnte das Transplantatüberleben postmortal entnommener Organe lediglich von 6.6 Jahre in 1989 auf 8.8 Jahre in 2005 gesteigert werden (2). Ähnlich überschaubare Verbesserungsraten konnten für das Transplantatüberleben von Lungen, Lebern, Pankreas und Herz gezeigt werden (3). Hiermit bleibt die Transplantationsmedizin Ihrem ausgeschriebene Ziel, eine lebenslange Therapie irreversibler Organversagen zu bieten, zurück. Aus diesem Grund ist eine Weiterführung der Forschung zur Verbesserung des Transplantatüberlebens solide transplantiertener Organe von großer Bedeutung. Durch seine Schlüsselrolle in der MHC-II vermittelten Antigenpräsentation stellt die Blockade von Cathepsin S in transplantationsassoziierten Abstossungsmodellen einen vielversprechenden Ansatz dar, um Abstossungsprozesse und den hierdurch entstehenden Organschaden zu lindern.

Cathepsin S

Cathepsine sind eine Gruppe von Proteasen, die überwiegend lysosomal bei einem pH von bis zu 2 katalytisch aktiv sind und von extern aufgenommene aber auch intern zu prozessierende Proteine spalten. Cat S wird von Antigen-präsentierenden Zellen mit pro-entzündlichen Zytokinen exprimiert. Im Gegensatz zu anderen Cathepsinen ist Cat S bei physiologischem pH katalytisch aktiv und kann so seine biologische Aktivität auch im Extrazellulärtraum entfalten. Cat S hat Matrix-degradierende Eigenschaften bei der Gewebeinfiltration von Makrophagen und aktiviert/degradiert parakrine Mediatoren im Gewebe. Cat S muss nicht enzymatisch aktiviert werden. Seine katalytische Aktivität wird durch endogene Proteaseinhibitoren, v.a. von Cystatin C kontrolliert.

Intrazelluläre Rolle von Cathepsin S bei der Antigen-Präsentation

Die Präsentation von Fremdantigenen basiert auf der Aufnahme antigener Peptide in den MHC/HLA Komplex in intrazellulären Vesikeln Antigen-präsentierender Zellen. Dieser Vorgang ist ein eng regulierter Prozess, bei dem das MHC Molekül zunächst im endoplasmatischen Retikulum heranreift. Um eine vorzeitige Aufnahme anderer Peptide in die Antigenbindungstelle zu verhindern, ist diese zunächst durch die sogenannte *invariant chain* (Li) blockiert. Die Li wird mehrfach enzymatisch gestützt bis das kleinste blockierende Stück (CLIP) am Ende gegen das antigene Peptid ausgetauscht wird. Cat S ist an dem letzten der Stützschritte beteiligt (s. Abb.). Fehlt Cat S oder wird die Cat S Aktivität pharmakologisch blockiert, kann CLIP nicht entstehen und es verbleibt die *invariant chain* an dem MHC gebunden. Dies verhindert letztlich ein MHC *loading* mit antigenem Peptid und damit die Antigenpräsentation. So unterdrückt eine Cat S Blockade die Antigen-Präsentation bei der Infektabwehr,



aber auch die Autoantigen-Präsentation bei Autoimmunkrankheiten. Mit den geplanten Arbeiten soll nun überprüft werden, inwieweit eine Cat S Blockade auch die Alloimmunität nach Organtransplantation unterdrücken kann. Cat S ist eine Cystein Protease mit intra- und extrazellulären Effekten. Als extrazellulärer Effekt ist die Spaltung elastischer Fasern bekannt was die Ausbildung von Makroangiopathien und Aneurysmata begünstigt. Cat S scheint zudem via Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR2) eine endotheliale Dysfunktion kleinerer Gefäße zu vermitteln. Cat S (und PAR2) Blockade ist somit auch direkt vasoprotектив, was v.a. für die Ausbildung der chronischen Transplantatsvaskulopathie Vorteile bringen könnte.

1.1.2 Wissenschaftlich begründete Darlegung der Unerlässlichkeit des Versuchsvorhabens unter Berücksichtigung des jeweiligen Standes der wissenschaftlichen Erkenntnisse (§ 7a Abs. 2 Nr. 1 TierSchG i. V. m. § 31 TierSchVersV) B)

-bitte Anlage Projektzusammenfassung beifügen (§ 31 Abs. 2 TierSchVersV); nicht erforderlich bei Anzeigen -

Erläuterungen:

Die Unerlässlichkeit des geplanten Versuchsvorhabens ergibt sich aus den - trotz intensiver Erforschung - noch immer nicht zufriedenstellenden Langzeitergebnissen bei der Transplantation solider Organe.

Neben den Problemen der generalisierten Immunsuppression, die zu vermehrten Infekten und Tumoren bei den Transplantatempfängern führen können, sind v.a. auch Probleme der Transplantatabstoßung zu nennen. Hierbei wird unterschieden zwischen „akuter“ und „chronischer“ Abstoßung. Während die heute zur Verfügung stehenden Medikamente eine gute Wirkung gegen die akute Abstoßung haben, gehen letztlich die Transplantate (hier v.a. die Nieren- und Herztransplantate) an den chronischen Abstoßungs-Veränderungen zugrunde. Die Inzidenz von akuten Abstoßungsepisoden nach Nierentransplantation wird mit 8-30% in der internationalen Fachliteratur angegeben. Gerade in Zeiten eines zunehmenden Organmangels und einer hierdurch bedingten Transplantation von zunehmend marginalen Organen ist die frühzeitige Protektion dieser Organe von zentraler Bedeutung um auch hier ein Langzeitüberleben zu erzielen. Hierbei korreliert die Anzahl der MHC-Mismatches direkt mit dem Auftreten und der Intensität von Abstossungsepisoden. Alloimmunität bei Organtransplantation richtet sich gegen Spender-spezifische Varianten in den Blutgruppenantigenen, den HLA/MHC Proteinen sowie gegen Gewebe-spezifische Antigene. Hierbei kommt es zu einer Prozessierung der Spenderantigene in Antigen-präsentierenden Zellen, die in den lymphatischen Organen des Empfängers via T und B-Zell Priming die klonale Expansion Alloantigen-spezifischer Lymphozyten induzieren. Dies führt dann zu akuten bis chronischen Abstoßungsprozessen mit humoralen und zellulären Effektorkomponenten. Entsprechend unserer Hypothese sollte die Präsentation von Spenderantigenen via MHC II Moleküle von Cat S abhängig sein. Dementsprechend sollte Cat S Blockade die Präsentation dieser Alloantigene verhindern und so die Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort sowie die nachfolgenden Abstoßungsreaktionen unterdrücken.

Die hochkomplexen immunologischen Abläufe nach Organtransplantation können nur *in vivo* verlässlich überprüft werden. Hierbei stellt die Maus von allen für Tierversuche verwandten Spezies, die am besten immunologisch charakterisierte dar. Demzufolge ist die Palette der verfügbaren Substanzen zur experimentellen pharmakologischen Beeinflussung immunologischer

und zellbiologischer Abläufe (Antikörper, Inhibitoren, Mediatoren) am breitesten.

Kurze Zusammenfassung der Zielsetzungen des Versuchsvorhabens:

Untersuchung einer Cathepsin S-Blockade in soliden Organtransplantationsmodellen mit Hinblick auf die Entstehung von akuten und chronischen Abstoßungsprozessen.

1.1.3 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass der Versuchszweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren (z. B. Zellkulturen, isolierte Organe etc.) als den Tierversuch erreicht werden kann (§ 7a Abs. 2 Nr. 2 TierSchG)

Erläuterungen:

-Die Vorgänge, die nach Transplantation zur akuten und chronischen Abstoßung mit Transplantatverlust führen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Zur weiteren Erforschung der hochkomplexen Mechanismen, die bei Abstoßung und Transplantatverlust auftreten, stehen keine guten *in vitro* Versuchsmöglichkeiten zur Verfügung, so dass schließlich valide *in vivo* Abstoßungsmodelle hierfür benötigt werden.

1.1.4 Ausschöpfung zugänglicher Informationsmöglichkeiten (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1b TierSchG)

1.1.4.1 Welche Informationsmöglichkeiten wurden genutzt C)?;

- bitte Anlage „Liste der Literaturzitate“ beifügen -

Schlüsselwörter:

Cathepsin S
Ischemia Reperfusion Injury
Acute rejection
Chronic rejection
Murine cardiac transplantation
murine renal transplantation
Transplant vasculopathy
Markers for acute and chronic rejection

Erläuterungen (z. B. Art der Recherche, verwendete Datenbanken):

Anhand der eingesehenen Literatur lässt sich feststellen, dass akute und chronische Abstoßungsreaktionen heutzutage zu den häufigsten Ursachen für den Verlust eines transplantierten Organs zählen. Alloimmunität bei Organtransplantation richtet sich gegen Spender-spezifische Varianten in den Blutgruppenantigenen, den HLA/MHC Proteinen sowie gegen Gewebe-spezifische Antigene. Hierbei kommt es zu einer Prozessierung der Spenderantigene in Antigen-präsentierenden Zellen, die in den lymphatischen Organen des Empfängers via T und B-Zell Priming die klonale Expansion Alloantigen-spezifischer Lymphozyten induzieren. Dies führt dann zu akuten bis chronischen Abstoßungsprozessen mit humoralen und zellulären Effektorkomponenten. Entsprechend unserer Hypothese sollte die Präsentation von Spenderantigenen via MHC II Moleküle von Cat S abhängig sein. Dementsprechend sollte Cat S Blockade die Präsentation dieser Alloantigene verhindern und so die Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort sowie die nachfolgenden Abstoßungsreaktionen unterdrücken. (Anlage 1)

Zeitpunkt der Recherche:

Kontinuierlich

1.1.4.2 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass das angestrebte Versuchsergebnis noch nicht hinreichend bekannt ist

Erläuterungen:

Die Bedeutung des Cathepsin S ist bisher nicht im Transplantationsversuch untersucht worden. Vorversuche zeigen einen günstigen Effekt einer Cathepsin S Blockade für die Autoimmunität (sprich Immunität gegen selbst/ **Extended report: Cathepsin S inhibition suppresses systemic lupus erythematosus and lupus nephritis because cathepsin S is essential for MHC class II-mediated CD4 T cell and B cell priming**). Derzeit existieren jedoch noch keine Daten zur „Alloimmunität“ (Immunität gegen transplantierte Organe derselben Spezies).

1.1.4.3 Handelt es sich um einen Doppel- oder Wiederholungsversuch D)? (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1b TierSchG)

Ja Nein

Wenn ja, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die Überprüfung bereits bekannter Versuchsergebnisse durch das beantragte Versuchsvorhaben unerlässlich ist.

Erläuterungen:

1.1.5 Art und Anzahl der vorgesehenen Tiere (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1c TierSchVersV)

1.1.5.1 Vorgesehene Tierarten, Begründung für die Wahl der Tierarten, Alter, ggf. Gewicht und Geschlecht (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1c TierSchVersV E)). Beschreibung der Linien und deren Bezeichnung nach der internationalen Nomenklatur

- ggf. Anlage „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ beifügen -

Erläuterungen:

Die Maus wurde für die Durchführung dieses Forschungsvorhabens ausgewählt aufgrund der gut entwickelten und international anerkannten Transplantationsmodelle. Diese Modelle stehen im engen Bezug zu humaner Organtransplantation. Das Immunsystem der Maus ähnelt dem des Menschen.

Des Weiteren stehen heutzutage viele Maus-spezifische Antikörper zur Verfügung, die zur Erforschung des zugrundeliegenden Mechanismus der akuten und chronischen Transplantatabstossung unabdingbar sind.

1.1.5.2 Vorgesehene Anzahl und Begründung für die Anzahl der Tiere einschließlich Angaben zur biometrischen Planung (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1c TierSchVersV F)

- ggf. Anlage „Statistisches Gutachten“ beifügen -

- ggf. Anlage Formblatt „Angaben zur biometrischen Planung“ verwenden -

Tierart	Gesamtzahl (incl. Reservetiere)
Maus	300 Tiere (siehe statistisches Gutachten)

Versuchs- und Kontrollgruppen F)

Erläuterungen:

Es handelt sich um Versuche im Mausmodell. Geplant sind unterschiedliche Transplantationsmodelle, weil verschiedene Organe unterschiedliche immunologische Prozesse mediieren. Kommt es nach einer Herztransplantation von Balb/c Mäusen auf C57Bl/6 beispielsweise zu einer fulminanten Abstossungsreaktion mit akutem Funktionsverlust des Transplantats nach ca. 8 Tagen nach Transplantation, ist der Verlauf nach einer Nierentransplantation deutlich moderater. Trotz akuter Abstossungsprozesse sind die Nierentransplantate oft noch über einen sehr langen Zeitraum funktionsfähig. Neben diesen „akuten“ Abstossungsmodellen sollen daneben auch Modelle für die „chronische Transplantatabstossung“ durchgeführt werden. International akzeptierte Modelle hierfür sind 1. Herztransplantationen von H-2bm12 auf C57Bl/6 Mäuse und 2. Als Modell der „chronischen Transplantatabstossung“ die Aortentransplantation von C57Bl/6 auf Balb/c Mäuse.

Folgende Versuchsreihen sind zur Durchführung oben aufgeführter Fragestellung geplant

A) Kontrolle der akuten Abstossungsmechanismen

Versuchsreihe Nr 1:

Nierentransplantationsmodell: (Balb/c auf C57bl/6)

Die Versuchsgruppentiere werden 1 Tag vor Tx mit dem CatS Inhibitor RO5459072 als „food ad mix“ behandelt. Es folgt die Transplantation einer Balb/c Spenderniere in eine C57Bl6 Maus. Nach 10 Tagen werden die Tiere getötet und die transplantierte sowie eigenen Nieren explantiert um für weitere histologische, molekularbiologische und immunologische Untersuchungen verarbeitet zu werden. Hierbei wird ebenfalls Serum entnommen um den Kreatinin und Harnstoff Wert zu bestimmen. Es wird im weiteren Verlauf ein TUNEL-Assay durchgeführt, um die apoptotischen Zellen darzustellen und Western Blot Analysen zur Expression der mitogen aktivierte Proteinkinasen p38, ERK und JNK. (was ist hier eigentlich der Zielparameter, der anzeigt dass Catsinhibition wirkt?)

- Kontrolle 1: Nieren-Tx, syngenes Modell (B6 auf B6), keine Therapie (Tag 10)
Gruppe 1: Nieren-Tx, allogenous Modell (Balb/c auf B6), keine Therapie (Tag 10)
Gruppe 2: Nieren-Tx, allogenous Modell (Balb/c auf B6), Therapie mit RO5459072 (Tag 10)

Versuchsreihe Nr 2:

Herztransplantation, akutes Abstossungsmodell (Balb/c auf C57bl/6)

Die Empfängertiere werden 1 Tag vor Transplantation mit dem CatS Inhibitor RO5459072 behandelt. Am Tag 7 nach der Transplantation werden die Tiere getötet und die Organe (eigen und transplantiert) zur histologischen, molekularbiologischen und immunologischen Untersuchung entnommen. Dazu werden auch Serum und die Milz entnommen. Die Histologie wird nach den gängigen akuten Abstossungs-Kriterien beurteilt. In einer weiteren Gruppe soll der Effekt des CatS Inhibitors RO5459072 auf das Transplantatüberleben untersucht werden. Es folgen tägliche Palpationen des Herzschlages. Der Zeitpunkt, an dem kein Herzschlag mehr tastbar ist, wird als Transplantatverlust eingestuft. Der Versuch wird dann beendet.

- Kontrolle 1: Herz-Tx, syngenes Modell (B6 auf B6), keine Therapie (Tag 10 Histologie)
Gruppe 1: Herz-Tx, allogenous Modell (Balb/c auf B6), keine Therapie (Tag 10 Histologie)
Gruppe 2: Herz-Tx, allogenous Modell (Balb/c auf B6), keine Therapie (Tx-Überleben)
Gruppe 3: Herz-Tx, allogenous Modell (Balb/c auf B6), Therapie mit RO5459072 (Tag 10 Histologie)
Gruppe 4: Herz-Tx, allogenous Modell (Balb/c auf B6), Therapie mit RO5459072 (Tx-Überleben)

B) Kontrolle der chronischen Abstossungsmechanismen

Versuchsreihe Nr 3:

A) Herztransplantation, chronisches Abstossungsmodell (H-2bm12 auf C57bl/6)

B) Aortentransplantation, chronisches Abstossungsmodell (Balb/c auf C57BL/6)

Die Empfängertiere werden 1 Tag vor Transplantation mit CatS Inhibitor RO5459072 behandelt. Am Tag 24 bzw. 28 werden die Tiere getötet und die Herzen/Aorten (eigen und transplantiert) zur histologischen und molekularbiologischen Untersuchung (RT-PCR) entnommen. Dazu wird auch Serum bei den Tieren entnommen. Die Histologie wird nach den gängigen chronischen Abstossungs-Kriterien beurteilt (Intima/Media Ratio).

- Kontrolle 1A: Herz-Tx, syngenes Modell (B6 auf B6), keine Therapie (Tag 24)
Gruppe 1A: Herz-Tx, (H-2bm12 auf B6), keine Therapie (Tag 24)
Gruppe 2A: Herz-Tx, (H-2bm12 auf B6), Therapie mit RO5459072 (Tag 24)
Kontrolle 1B: Aorten-Tx (B6 auf B6), Keine Therapie (Tag 28)
Gruppe 1B: Aorten-Tx (Balb/c auf B6), keine Therapie (Tag 28)
Gruppe 2B: Aorten-Tx (Balb/c auf B6), Therapie mit RO5459072 (Tag 28)

Angaben zur biometrischen/statistischen Planung

Erläuterungen:

Die Statistik für das geplante Versuchsvorhaben wurde in Zusammenarbeit mit Herr Dr. Jürgen Peters des Walter Brendel Zentrums des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Nähere Informationen können dem beigefügten statistischen Gutachten entnommen werden

Hauptzielgröße(n):

Versuchsreihe 1: Serum Kreatinin 24h nach Reperfusion

Versuchsreihe 2: Mittleres Transplantatüberleben

Versuchsreihe 3: Mittlere Intima/Media Ratio

Nebenzielgröße(n):

Histologie der Transplantate, palpatorische Funktion des Herztransplantats

Studentyp

- a) Orientierungsstudie
- b) Vergleichsstudie

Es werden folgende biometrische Verfahren zur Auswertung eingesetzt:

Shapiro-Wilk-Test, ANOVA bei vorliegender Normalverteilung; nicht-parametrische Varianzanalyse bei Nicht-Normalverteilung; bei Signifikanz als post-hoc Test Studetd-Newman-Keuls Test.

Die vorgesehene Tierzahl und Gruppengröße ist zur statistischen Absicherung mit

- einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art von
0.05
- einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art von
0.2
- einer biologisch relevanten Differenz
siehe Anlage
- Varianz oder Effektstärke (mit Angabe des genutzten Parameters, z. B. Effektstärke nach Cohen)
siehe Anlage

notwendig

Die biometrische Planung ist ggf. durch das Gutachten einer Statistikerin/eines Statistikers zu erläutern.

Weitere Erläuterungen:

1.1.5.3 Herkunft der Tiere

Charles River Wiga GmbH
Sandhofer Weg 7
97633 Sulzfeld
Deutschland
Tel.: 09761/406-0
Fax: 09761/406-60

1.1.5.4 Handelt es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere (§§ 19 bis 24 TierSchVersV)? G)

Ja

Aus welcher/welchen Zucht/Zuchten (Name und Anschrift) stammen die Tiere?

Charles River Wiga GmbH
Sandhofer Weg 7
97633 Sulzfeld
Deutschland
Tel.: 09761/406-0
Fax: 09761/406-60

Nein

- Es handelt sich um Landwirtschaftliche Nutztiere H¹
- Antrag auf Zulassung einer Ausnahme nach § 19 Abs. 1 Satz 2, § 20 Abs. 1 Satz 2 oder § 21 Satz 2 TierSchVersV ist gesondert beigelegt
- Antrag auf Zulassung einer Ausnahme nach § 19 Abs. 1 Satz 2 bzw. § 20 Satz 2 TierSchVersV wird hiermit gestellt

Erläuterungen:

1.1.5.5 Die vorgesehenen Tiere wurden bereits in einem Versuchsvorhaben im Sinne des § 18 TierSchVersV verwendet H)

- Im Falle der Verwendung von Primaten Anlage 5 beifügen –

Ja Nein

Wenn Ja, Beschreibung der Art, Dauer und Belastung der bislang erfolgten Eingriffe an den betreffenden Tieren, Aktenzeichen und Angabe der zuständigen Behörde; tierärztliche Empfehlung beifügen (§ 18 Abs. 1 Nr. 4 TierSchVersV):

1.2 Angaben zur praktischen Durchführung

1.2.1 Ort der Versuchstierhaltung und Ort der Durchführung, vorgesehener Beginn (Datum) und voraussichtliche Dauer des Versuchsvorhabens (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1 e TierSchVersV) J)

Ort der Versuchstierhaltung mit Anschrift und Gebäude-/Raumnummer:

Institut für Chirurg. Forschung, Walter-Brendel-Zentrum Marchioninistraße 27, 81377 München

Ort der Versuchsdurchführung mit Anschrift und Gebäude-/ Raumnummer:

Institut für Chirurg. Forschung, Walter-Brendel-Zentrum Marchioninistraße 27, 81377 München

Beginn:

sofort nach Genehmigung

Dauer:

18 Monate

1.2.2 Beschreibung der Haltungsbedingungen und der Vorbereitung der Tiere auf den Versuch (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 5 TierSchG) J)

Erläuterungen:

Die Untersuchungen werden an 8-10 Wochen alten, männlichen Mäusen mit einem Körpergewicht von 18-25 g durchgeführt.

Die Haltung der Tiere erfolgt im Walter Brendel Zentrum entsprechend den erforderlichen speziellen

Hygienebedingungen (FELASA erweitert) in dafür eingerichteten Räumen. Die Mäuse werden gewichtsabhängig in Standard Makrolon Käfigen (Gruppenhaltung bei Tieren mit > 20 g KGW = 5 Tiere / Käfig Typ II long) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bei einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Raumtemperatur liegt im Mittel bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$, die rel. Luftfeuchtigkeit bei 55 ± 5%. Als Einstreu wird zertifizierte, staubarme Weichholzfaser verwendet. Die Fütterung erfolgt ad libitum mit einem standardisierten, pelletierten Alleinfuttermittel für Mäuse. In der Zucht erfolgt die Fütterung mit speziellem Alleinfuttermittel für Zuchttiere. Wasser steht den Tieren aus Tränkenflaschen ad libitum zur Verfügung.

1.2.3 Beschreibung des Hygienemanagements J)

Hygienestatus der Versuchstiere/der Tierhaltung:

Erläuterungen:

Ein Käfig- und Flaschenwechsel erfolgt nach spätestens einer Woche mit anschließender Reinigung in der Käfigspülmaschine. Käfigdeckel werden i.d.R. alle 2 Wochen gewechselt und gereinigt. Zur Vermeidung der Einschleppung von Krankheitserregern und zur Stressreduktion der Tiere wird grundsätzlich der Personenverkehr im Tierhaltungsbereich auf ein Minimum reduziert. Der gesamte Tierhaltungsbereich im 1. und 4. Obergeschoss ist nur mittels eines speziellen Transponders zu erreichen und nur mit Überziehschuhen oder institutseigenen Schuhen zu betreten. Die Tierhaltung darf nicht betreten werden, wenn man den Verdacht hat an potentiell infektiösen Krankheiten zu leiden (z.B. Durchfallerkrankungen, Erkältungen).

Von der Zucht über die Haltung zur Schleuse und zum Reinigungsraum besteht ein abfallender Druckgradient. Das Personal gelangt über eine Nassschleuse und nach Anlegen von sauberer Dienstkleidung in die Tierhaltung. Wissenschaftler müssen vor dem Betreten der Tierhaltung Schutzkleidung anlegen. Hier ist der Zugang streng limitiert. Der Gesundheitsstatus der Tiere wird nach den FELASA Richtlinien überprüft: vierteljährlich nach dem erweiterten FELASA-Protokoll. Daneben erfolgen situationsbedingt kleinere, stichprobenartige Untersuchungen nach dem kleinen FELASA-Protokoll.

Enrichment:

Als Enrichement kommt zertifizierte grobe Einstreu (Abbed Nestbaumaterial NGB E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E014, Faserbreite'120 mm) zum Einsatz. Additiv werden zertifizierte, autoklavierbare Spieltunnel aus Nagerhölzern eingesetzt. In der Zucht kommen des Weiteren Mäusehäuschen aus zertifiziertem, rotem Kunststoff zum Einsatz.

Tiere im Versuch:

Die Tiere werden frühestens 7 Tage nach Anlieferung in den Versuch genommen, damit sie sich an die veränderten Umweltbedingungen adaptieren und vom Transportstress erholen können.

Hygienemonitoring:

Erläuterungen:

Untersuchung von Sentinel-Tieren wird vierteljährlich nach den erweiterten Bestimmungen der FELASA durchgeführt.

Wurden in dem Tierhaltungsbereich aktuell Organismen nachgewiesen, die gemäß Hygienemanagement nicht vorhanden sein sollen?

Ja Nein wurde nicht untersucht (bitte begründen)

Wenn Ja: Um welche Keime handelt es sich?

Inwieweit ist bekannt, ob diese die Versuchsergebnisse beeinflussen können?

Welche Maßnahmen werden ergriffen, um eine Infektion der Tiere für das beantragte Versuchsvorhaben mit den oben genannten Keimen zu verhindern?

Erläuterungen:

1.2.4 Beschreibung der praktischen Durchführung aller Eingriffe und Behandlungen bezogen auf die jeweilige Versuchsgruppe in ihrer Art und Dauer und Berücksichtigung des Betäubungsverfahrens; detaillierte Darstellung sämtlicher Maßnahmen mit zeitlichem Verlauf (§ 17 i. V. m. § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1d TierSchVersV)

Erläuterungen:

1) Maus-Herztransplantation:

Sämtliche Operationen erfolgen in MMF-Narkose (Medetomidin (0,5mg/kgKG), Midazolam (5mg/kgKG) und Fentanyl (0,05mg/kgKG)).

Zunächst folgt die Explantation. Das Abdomen des Spendertieres wird eröffnet und Heparin in die Vena cava inferior injiziert. Nach ca. 60 Sekunden werden ca. 3 ml eiskalter HTK-Lösung (Kardioplegie nach Bretschneider) über die Vena cava injiziert. Dadurch wird der Herzstillstand erreicht. Es wird nun der Brustkorb eröffnet und retrograd die Aorta ascendens mit der kardioplegen Lösung perfundiert. Dann werden die Aorta ascendens und der Truncus pulmonalis freipräpariert und durchtrennt. Die restlichen, dem Herzen zuführenden Gefäße werden zusammen ligiert und ebenfalls durchtrennt. Das entnommene Transplantat wird in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Nun wird die Bauchdecke des Empfängers in der Medianlinie längs eröffnet und der Aorto-Cavale-Gefäßstrang aufgesucht. Aorta abdominalis und Vena cava inferior werden unterhalb des Abgangs der Nierengefäße stumpf aus dem umliegenden Fettgewebe heraus-präpariert. Die Bauchgefäße des Empfängers werden mit Gefäßklemmen ausgeklemmt. Dann wird die Aorta, später die Vena cava inferior längs eröffnet und mit der Aorta ascendens bzw. Truncus pulmonalis des Transplantats Seit-zu-End verbunden. Dies geschieht in mikrochirurgischer Technik unter dem OP-Mikroskop mit 10-0 Prolene. Während der Transplantation wird das Herz durch Aufbringen eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Nach Fertigstellung der Anastomosen werden die Klemmen entfernt und eventuelle Blutungen werden sorgfältig gestillt. Nach ca. 30-60 Sekunden beginnt das transplantierte Herz zu schlagen. Es folgt der Verschluß des Abdomens mit 5-0 Prolene. Postoperativ erhalten die Mäuse Analgetika (s.u.).

Mögliche Komplikationen sind im Wesentlichen Probleme mit den Anastomosen (Nähen der Gefäße).

1. Gefäßnaht (=Anastomose) der Arterie: Bei Einengung kommt es zu einem verringerten arteriellen „Zstrom“ in das transplantierte Organ. Äußerliche Zeichen sind fehlende Perfusion des Organs mit Blut vom Empfänger.

2. Gefäßnaht (=Anastomose) der Vene: Bei Einengung kommt es zu einem verringerten venösen „Abstrom“ aus dem transplantierten Organ in die V. Cava des Empfängers. Äußerliche Zeichen sind Anschwellen des Organs durch das einströmende Blut und schließlich Thrombosierung.

Abbruch (Töten des Versuchstiers):

- Bei Auftreten einer der oben genannten Komplikationen.
- Bei einem postoperativen Gewichtsverlust von 10-15% oder protrahierter Lethargie des Versuchstiers wird abgebrochen.

2) Maus-Nierentransplantation:

Die Nierentransplantation in der Maus wird in Anlehnung an die von Russell et al. beschriebenen Technik durchgeführt. Sobald die Tiere narkotisiert sind, werden Bauch- und Brustbereiche mit Alkohol gereinigt. Zunächst wird das Abdomen des Spendertieres eröffnet. Es werden die linke Arteria, Vena renalis und der linke Ureter freipräpariert. Zusätzlich wird die Aorta und Vena cava kranial und kaudal der Nierengefäße freigelegt. Es folgt eine Injektion von Heparin in die Vena cava inferior. Nach ca. 60 Sekunden wird die Aorta kranial der Nierengefäße ausgeklemmt und ca. 3 ml eiskalter NaCl-Lösung über die Aorta abdominalis verbreitet, um die Nieren des Spenders zu perfundieren. Gleichzeitig wird die V. cava eingeschnitten, um für den nötigen Ablauf zu sorgen. Nach erfolgter Perfusion werden die Nierengefäße mit jeweils einem Patch von der Aorta und der V. cava und der Ureter mit einem Patch aus dem Blasendach abgesetzt. Das Transplantat wird entnommen und in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Die Bauchdecke des Empfängers wird anschließend in der Medianlinie längs eröffnet und der Aorto-Cavale-Gefäßstrang aufgesucht. Aorta abdominalis

und Vena cava inferior werden auf Höhe und unterhalb der Nierengefäße stumpf aus dem umliegenden Fettgewebe herauspräpariert. Die rechte Arteria, Vena renalis und der rechte Ureter werden freipräpariert, ligiert und durchtrennt. Danach wird die gesamte rechte Niere des Empfängers entfernt. Die Bauchgefäße des Empfängers werden mit Gefäßklemmen ausgeklemmt. Dann wird die Aorta abdominalis, und die Vena cava inferior längs eröffnet, um mit den Nierengefäßen des Transplantats End-zu-Seit anastomosiert zu werden. Dies geschieht in mikrochirurgischer Technik unter dem OP-Mikroskop (bis zu 40-fache Vergrößerung) mit 10-0 Prolene. Während der Transplantation wird die Niere durch Aufbringen eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Nach Fertigstellung der Anastomosen werden die Klemmen entfernt und so der Blutstrom in das Transplantat wieder hergestellt. Eventuelle Blutungen werden sorgfältig gestillt. Zur Reanastomosierung des Ureters wird das Blasendach des Empfängertiers eingeschnitten. In die so entstandene Öffnung wird der Blasendachpatch der Spenderniere eingenäht. Dies geschieht ebenfalls mit der mikrochirurgischen Nahttechnik mit 10-0 Prolene. Damit es bei späteren Bewegungen des Tieres nicht zu einem Abknicken der Gefäße des Transplantats kommt, wird die Niere noch mit ihrer Gerota-Faszie am umliegenden Gewebe vernäht.

Der Bauchverschluss erfolgt mit 5-0 Prolene. Abschließend werden den operierten Tieren noch ca 1-1,5 ml sterilem NaCl 0,9% subkutan verabreicht zur Flüssigkeitssubstitution. Dies wird an den 3 folgenden postoperativen Tagen wiederholt. Postoperativ erhalten die Mäuse Analgetika (siehe unten). Intra- und postoperativ werden die Versuchstiere auf Wärmematten gewärmt.

Komplikationen:

Mögliche Komplikationen sind im Wesentlichen Probleme mit den Anastomosen (Nähen der Gefäße bzw. des Ureters).

1. Gefäßnaht (=Anastomose) der Arterie: Bei Einengung kommt es zu einem verringerten arteriellen „Zstrom“ in das transplantierte Organ. Äußerliche Zeichen sind fehlende Perfusion des Organs mit Blut vom Empfänger.
2. Gefäßnaht (=Anastomose) der Vene: Bei Einengung kommt es zu einem verringerten venösen „Abstrom“ aus dem transplantierten Organ in die V. Cava des Empfängers. Äußerliche Zeichen sind Anschwellen des Organs durch das einströmende Blut und schließlich Thrombosierung.
3. Naht des Ureters an das Blasendach: Da der Ureter nicht direkt, sondern mit einem Patch aus dem Blasendach an der Blase des Empfängers anastomosiert wird, ist es unwahrscheinlich aber nicht ausgeschlossen, dass es zu einem Problem im Sinne eines „postrenalen“ Harnstaus kommt. Während der Transplantation lässt sich eine mögliche Einengung dieser Anastomose nicht überprüfen.
4. Das größere Problem ist die ausreichende Perfusion des Blasendachpatches. Diese lässt sich aber bereits intraoperativ abschätzen, so dass der Versuch bei potentiellen Perfusionssproblemen bereits hier beendet werden kann.

Abbruch (Töten des Versuchstiers):

- Bei Auftreten einer der oben genannten Komplikationen.
- Bei einem postoperativen Gewichtsverlust von 10-15% oder protrahierter Lethargie des Versuchstiers wird abgebrochen.

3) Aortentransplantation nach Dietrich et al:

Sämtliche Operationen erfolgen in MMF-Narkose (Medetomidin (0,5mg/kgKG), Midazolam (5mg/kgKG) und Fentanyl (0,05mg/kgKG))

Operation: Für das oben beschriebene Modell werden wir die von Dietrich et al. erst beschriebene Technik der heterotopen Aortentransplantation nutzen. Hierbei erfolgt eine Transplantation der thorakalen Spenderaorta in die Carotis communis des Empfängertiers unter Verwendung einer „non-suture-cuff-technique“.

Spender Präparation: Die Tiere werden primär mit einem elektrischen Haartrimmer rasiert. Hiernach wird das Operationsareal desinfiziert und das Tier an der Operationsmatte fixiert. Eine mediane Laparotomie wird durchgeführt und eine Mischung von Heparin-NaCl (1/10) wird dem Tier über die Vena Cava inferior appliziert. Kurz hiernach wird die abdominelle Aorta durchtrennt. Nachfolgend wird eine Thorakotomie durchgeführt. Nun kann das thorakale Organpaket (Herz, Lunge, Ösophagus) entfernt werden. Nun wird die thorakale Aorta mittels bipolarer Pinzette vorsichtig herausgetrennt.

Empfänger Präparation: Primär wird die Operationsstelle rasiert und desinfiziert. Nachfolgend wird die Maus an die Operationsmatte fixiert. Eine Hautinzision wird durchgeführt und reicht vom Sternum bis zur Manibularwinkel der linken Seite. Das Platysma wird mittels 2 gebogener Pinzetten durchtrennt. Nachfolgend erreicht man einen freien Blick auf den linken Lappen der Glandula submandibularis, welcher im nächsten Schritt mittels elektrischer Koagulation durchtrennt wird. Der nun sichtbar werdende Musculus sternoclavicularis wird ebenfalls nach Koagulation mittels bipolarer Pinzette durchtrennt.

Nachfolgend wird die Arterie mobilisiert, von der Bifurkation am distalen Ende bis so weit wie möglich proximal. Nun wird die Arterie in ihrer Mitte mittels 8-0 Seidenligatur doppelt ligiert und zwischen den Ligaturen durchtrennt. Das proximale und distale Ende kann nun durch einen vorgefertigten Cuff aus autoklavierbarem Nylonrohr mit einem Außendurchmesser von 0.63mm und eine Innendurchmesser von 0.5mm durchgeführt werden. Die Länge des Cuffs beträgt 2mm, bestehend aus einem 1mm messendem Körper und einem 1mm messendem Hals, der zur Fixierung des Cuffs an der Arterie mittels atraumatischen arteriellen Klemmen (Yarsagyl Aneurysma-Clips) dient. Nun kann die Ligatur der Arterie entfernt werden und die Arterie wird mittels Heparin-NaCl gespült. Im nächsten Schritt wird die Arterie mittels Gefäßdilatatoren erweitert und über den Cuffkörper gestülpt und nachfolgend mittels einer 8-0 Seidenligatur an diesem fixiert. Dies erfolgt sowohl am distalen als auch am proximalen Ende der Arterie.

Aortentransplantation: Die Aorta der Spendermaus wird nun über die zuvor gefertigten arteriellen Cuffs gestülpt und an diesen mittels 8-0 Seidenligatur fixiert.

Nun kann der Blutfluss wieder hergestellt werden, indem primär die distale arterielle Klemme entfernt wird und nachfolgend die proximale Klemme. Nach ausgiebiger Kontrolle auf Bluttrockenheit kann anschließend die Haut mittels 4-0 Nylon Nahtmaterial verschlossen werden.

Gesamtdauer des Eingriffs mit Explantation und Implantation wird mit 45 min pro Tier berechnet.

Komplikationen:

Mögliche Komplikationen sind im Wesentlichen Probleme mit den Anastomosen (Nähte der Gefäße).

1. Arterieller Cuff: Mögliches Einreißen der Arterie beim Versuch die Arterie über den Cuff zu stülpen.
2. Blutungen
3. Infektionen

Abbruch:

-Bei Auftreten einer der oben genannten Komplikationen.

-Bei einem postoperativen Gewichtsverlust von 10-15% oder protrahierter Lethargie des Versuchstiers wird abgebrochen.

1.2.5 Werden schmerzhafte Eingriffe ohne Betäubung durchgeführt?

Ja Nein

Wenn Ja

Erläuterungen:

1.2.6 Beschreibung und Begründung von Maßnahmen zur Schmerzlinderung bzw. deren Unterlassung (§ 17 TierSchVersV);

-Angaben nicht erforderlich für Anzeigen nach § 8a Abs. 3 TierSchG (Versuche an Zehnfußkrebsen) -

Erläuterungen:

Es wird bei allen Tieren die MMF-Anästhesie durchgeführt (Medetomidin (0,5mg/kgKG), Midazolam (5mg/kgKG) und Fentanyl (0,05mg/kgKG)). Während der ersten 3 postoperativen Tage erhalten die Tiere Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg/kg KG) s.c. 2x/Tag. Dies wird durch Dr. Thomas, Dr. Drefs bzw. Fr. Anne Tischer (MTA mit langjähriger tierexperimenteller Erfahrung), bzw. Cand. Med. Benjamin Ehle durchgeführt.

1.2.7 Werden an einem Tier erheblich schmerzhafte und dauerhaft anhaltende Eingriffe oder Behandlungen durchgeführt, die nicht gelindert werden können? (§ 25 Abs. 2 TierSchVersV);

-Angaben nicht erforderlich für Anzeigen nach § 8a Abs. 3 TierSchG (Versuche an Zehnfußkrebsen) -

Ja Nein

Wenn Ja

Erläuterungen:

1.2.8 Vorgesehene Maßnahmen und Kontrollen im Rahmen der medizinischen und tierärztlichen Versorgung z. B. Hormonsubstitution, Antibiose, Verbandswechsel, spezielle Haltungsbedingungen aufgrund hygienischer Anforderungen oder Erkrankungsneigungen der vorgesehenen Tiere

Erläuterungen:

Die Kontrolle beinhaltet tägliche Untersuchungen des Tieres. Nach der Herztransplantation muss zudem das transplantierte Herz täglich auf seine Funktion hin kontrolliert werden. Das geschieht durch einfache Palpation des Herzens durch die Bauchdecken. Spezielle Haltungsbedingungen sind dabei nicht notwendig.

1.2.9 Beschreibung und Bewertung der Belastung (Intensität und Dauer von Schmerzen, Leiden oder Schäden), wissenschaftliche Begründung der Einstufung des Schweregrads nach Artikel 15 Abs. 1 i. V. m. Anh. VIII der RL 2010/63/EU bezogen auf die jeweilige Tierart und Versuchsgruppe in Anlehnung an die Ausführungen zu Ziff. 1.2.4 L) unter Benennung konkreter Abbruchkriterien. (In diesem Zusammenhang auch Darstellung Genotyp-bedingter Belastungen genetisch veränderter Tiere) (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2b TierSchVersV)

- bitte Anlage „Belastungstabelle“ beifügen -

- ggf. Anlage „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ beifügen bzw. prospektive Einschätzung der phänotypischen Belastung -

Erläuterungen:

Die Empfängerpräparation und Transplantation wie auch die Organexplantation beim Spender werden unter Vollnarkose durchgeführt. Die chirurgische Toleranz wird nach 5 Minuten erreicht. Die heterotope Transplantation belastet die Tiere am OP-Tag mäßig, weil bei diesen Eingriffen nichts reseziert werden muss. Das eigentliche Trauma besteht aus dem Zugang (mediane Laparotomie), dem Ausklemmen der großen Gefäße (Aorta und V. cava) und der Narkose. Kommen keine Komplikationen mit den Gefäßnähten hinzu geht das Belastungsniveau rasch runter (bereits am 1. postoperativen Tag auf „gering“) und die Tiere haben nach 2-3 Tagen ihr Ausgangsniveau wieder erreicht (s. Belastungstabelle). Schon kurze Zeit (ca. 40 min - 1 std.) nach der Operation bewegen sie sich wieder frei im Käfig und nehmen Flüssigkeit und Nahrung auf.

Bei der Aortentransplantation wird durch die Verwendung des cervicalen Zugangs das operative Trauma verringert. Die heterotope Aortentransplantation belastet die Mäuse am OP Tag mäßig. Bereits am ersten postoperativen Tag sinkt die Belastung auf gering.

Eine Belastung von 5 Punkten (Score sheet) sind für 10 Tage und eine Belastung von 10 für 5 Tage zu tolerieren.

1.2.10 Benennung konkreter Abbruchkriterien (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1d) TierSchVersV)

- bitte Anlage „Score Sheet“ beifügen -

1.2.11 Aufzeichnungen (§ 9 Abs. 5 Satz 1 TierSchG i. V. m. § 29 TierSchVersV) M)

- bitte Aufzeichnungsmuster beifügen -

1.3 Ethische Vertretbarkeit des Versuchs (§ 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG) N)

1.3.1 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind (§ 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG)

Erläuterungen:

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin bleibt diese deutlich hinter ihrem ausgerufenen Ziel, eine lebenslange Therapie bei terminalem Organversagen zu sein, zurück. Neben akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen müssen die zum Teil schweren Nebenwirkungen der lebenslang einzunehmenden Immunsuppressiva beachtet werden. Ohne Tierversuche wird es auf diesem Gebiet keine Fortschritte geben. Rein zelluläre Versuchsansätze bringen natürlich Fortschritte. Aber auch diese müssen zunächst in aufwendigen Tiermodellen wie diesen überprüft werden

1.3.2 Bei länger anhaltenden oder sich wiederholenden erheblichen Schmerzen oder Leiden, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass das angestrebte Versuchsergebnis vermutlich für wesentliche Bedürfnisse von Mensch oder Tier einschließlich der Lösung wissenschaftlicher Probleme von hervorragender Bedeutung ist (§ 25 Abs. 1 TierSchVersV)

Bei erheblichen Schmerzen oder länger anhaltenden Leiden, die nicht gelindert werden können, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die Durchführung des Tierversuchs wegen der Bedeutung der angestrebten Erkenntnisse unerlässlich ist (§ 25 Abs. 2 TierSchVersV).

- Angaben nicht erforderlich für Anzeigen nach § 8a Abs. 3 TierSchG (Versuche an Zehnfußkrebsen) -

Erläuterungen:

1.4 Verfahren am Versuchsende (§ 28 TierSchVersV)

Beabsichtigter Verbleib der Tiere:

- Tötung während des Versuchs bzw. vor Erwachen aus der Narkose
- Tötung nach einer Beobachtungszeit von 10-28 Tagen
- Weiterleben der Tiere ohne Beeinträchtigung des Wohlbefindens.

Verbleib der Tiere nach dem Ausscheiden aus dem Versuch:

Tötungsverfahren (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1g TierSchVersV):

Die Tiere werden in Vollnarkose (MMF Narkose wie oben beschrieben) entblutet durch Durchtrennung der abdominalen Aorta und V. Cava

1.5 Bei Durchführung mehrerer gleichartiger Vorhaben nach § 8a Abs. 1 TierSchG die voraussichtliche Zahl der Vorhaben (§ 37 Abs. 1 TierSchVersV) O

2. Personelle Voraussetzungen

2.1 Leitung des Versuchsvorhabens und Stellvertretung (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 TierSchG i. V. m. § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1f TierSchVersV) P

2.1.1 Leiterin/Leiter des Tierversuchsvorhabens

Name:

PD Dr. med. J. Andrassy

Beruf: Arzt

Nachweis der Ausbildung und der Kenntnisse und Fähigkeiten und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?): Q)

Seit 2000 tierexperimentelle Erfahrung an der Uni-Regensburg, University of Wisconsin und ab 2004 an der LMU München. Es liegen eine Vielzahl an bewilligten Versuchsvorhaben vor.

- ist beigelegt
- ist bereits mit Geschäftszeichen 17/05, 03/06, 92-05, 28-09, 127-13 bei dieser Genehmigungs-

behörde vorgelegt worden (alternativ können auch Kopien von Bescheiden anderer Genehmigungsbehörden als Nachweis vorgelegt werden)

2.1.2 Stellvertretende Leitung des Tierversuchsvorhabens (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 TierSchG i. V. m. § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1f TierSchVersV)

Name:

Dr. Michael Thomas

Beruf: Arzt

Nachweis der Ausbildung und der Kenntnisse und Fähigkeiten und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?): Q

- ist beigefügt
 ist bereits mit Geschäftszeichen 28-09, 127-13 bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden (alternativ können auch Kopien von Bescheiden anderer Genehmigungsbehörden als Nachweis vorgelegt werden)

2.1.3 Versuchsplaner (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1f TierSchVersV)

Name:

PD Dr. Andrassy

Beruf:

Nachweis der Ausbildung, der Kenntnisse und Fähigkeiten und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?): Q

- ist beigefügt
 ist bereits mit Geschäftszeichen bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden (alternativ können auch Kopien von Bescheiden anderer Genehmigungsbehörden als Nachweis vorgelegt werden)

2.2 Personen, die bei Vorhaben nach § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG die Lehrinhalte vermitteln Q, R)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde

2.3 Personen, die bei Vorhaben nach § 8a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG ausgebildet werden S)

Name	Studienrichtung, Berufsausbildung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde

2.4 Personen, die im Rahmen der Versuchsdurchführung Eingriffe und Behandlungen sowie Tötungen an Tieren durchführen R)

Sofern für einzelne Personen eine Ausnahmegenehmigung nach § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV erforderlich ist, verwenden Sie bitte das eigens dafür vorgesehene Formular R)

2.4.1 Personen mit abgeschlossenem Hochschulstudium (Nachweis beilegen)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
PD Dr. Joachim Andrassy	Medizin	Operationen, Verlaufskontrollen	15 Jahre	17/05, 03/06, 92-05, 28-09, 127-13
Dr. Michael Thomas	Medizin	Operationen, Verlaufskontrollen	8 Jahre	28-09, 127-13
Moritz Drefs	Medizin	Operationen, Verlaufskontrollen	2 Jahre	100/11

2.4.2 Doktorandinnen/Doktoranden bzw. Diplandandinnen/Diplomanden ohne Studienabschluss (Immatrikulationsbescheinigung beilegen)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Benjamin Ehle, cand. med.	Medizin	Durchführung Herz- und Nierentransplantation	3 Monate	62-14

2.4.3 Nichtakademisches, technisches und pflegerisches Personal (Berufsnachweis beilegen)

Name	Berufsausbildung	Art der Versuchsbeteiligung (Behandlungen, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen etc.); bitte detaillierte Auflistung der einzelnen Eingriffe und Behandlungen	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung bzw. Fachkenntnisse in Versuchstierhaltung und -pflege (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Anne Tischer	MTA	Verlaufskontrollen ???	6 Jahre	28-09, 127-13

2.5 Im Falle einer Betäubung Namen der Personen, welche die Betäubung durchführen oder die Durchführung der Betäubung im Rahmen einer Aus-, Fort und Weiterbildung beaufsichtigen T)

Name	Berufsausbildung	Tierexperimentelle, versuchstierkundl. Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
PD Dr. med. J. Andrassy	Medizin	14 Jahre	siehe oben
Dr. med. M. Thomas	Medizin	8 Jahre	siehe oben
Benjamin Ehle	Medizin	4 Monate	62-14

2.6 Berechtigung der Personen zur Benutzung der Einrichtung, in der die Tierversuche durchgeführt werden (§ 8 Abs. 2 TierSchG)

2.6.1 Sind die genannten Personen bei der Einrichtung beschäftigt?

Ja Nein

2.6.2 Wenn Nein, sind sie mit Zustimmung der verantwortlichen Leitung der Einrichtung zur Benutzung der Einrichtung befugt?

Ja

Art und Umfang der Befugnisse (bitte schriftliche Bestätigung der verantwortlichen Leitung der Einrichtung beifügen):
Von Herrn Prof. Pohl erteilt. Durchführung von der Regierung von Oberbayern bewilligten tierexperimentellen Versuchsvorhaben

2.7 Personen, die für die Pflege, Betreuung und medizinische Versorgung der Versuchstiere verantwortlich sind:

2.7.1 Namen, dienstliche Anschrift und Qualifikation der für die Pflege und Betreuung der Tiere verantwortlichen Personen:

Name	Dienstliche Anschrift	Qualifikation
Fr. Blount	Walter-Brendel-Institut für experimentelle Medizin, Marchionistrasse 15, 81377 München	IHK - geprüfte Tierpflegerin

2.7.2 Namen, dienstliche Anschrift und Qualifikation der für die medizinische Versorgung verantwortlichen Personen:

Name	Dienstliche Anschrift	Qualifikation

Dr. M. Shakarami	Walter Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin, Marchioninistraße 27, 81377 München	Tierarzt

- 2.7.3 Name und dienstliche Anschrift der Tierärztin/des Tierarztes, der/dem nach Abschluss des Versuchs die überlebenden Tiere der in § 28 Abs. 1 Satz 2 TierSchVersV genannten Arten vorgestellt werden:**

Name	Dienstliche Anschrift
entfällt	

3. Organisatorische Voraussetzungen

3.1 Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

Name	Dienstliche Anschrift, Telefon, Telefax, E-Mail
Professor Dr. med. Georg Enders	Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin Marchionistrasse 27, 81377 München,

- 3.2 Sind die Voraussetzungen zur Aufgabenerfüllung der Tierschutzbeauftragten/des Tierschutzbeauftragten gegeben (§ 10 TierSchG i. V. m. § 5 TierSchVersV)?**

Ja Nein

- 3.3 Hat die Tierschutzbeauftragte/der Tierschutzbeauftragte eine Stellungnahme nach § 5 Abs. 4 Satz 2 Nr. 1 TierSchVersV abgegeben? (Angabe entfällt bei Anzeigen)**

liegt bei wird nachgereicht

- 3.4 Sind die zur Durchführung des Versuchsvorhabens erforderlichen Anlagen, Geräte und sonstigen sachlichen Mittel vorhanden (§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 3 TierSchG)? (Hierzu ist ein Nachweis erforderlich für den die Stellungnahme der /des Tierschutzbeauftragten in Frage kommt)**

Ja Nein

- 3.5 Sind die notwendigen organisatorischen Voraussetzungen gegeben? (Hierzu ist ein Nachweis erforderlich, für den die Stellungnahme der /des Tierschutzbeauftragten in Frage kommt)**

Ja Nein

- 3.6 Ist eine den Anforderungen des § 2 TierSchG i. V. m. § 1 und § 15 TierSchVersV entsprechende Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere sowie ihre medizinische Versorgung sichergestellt an den jeweiligen Orten?**

Ja Nein Siehe Stellungnahme Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

Anonymisierung des Antrags U):

Ich verzichte auf eine Anonymisierung des Antrags Ja Nein

(Im Falle einer gewünschten Anonymisierung müssen die für die Kommission vorgesehenen Unterlagen anonymisiert und gekennzeichnet beigefügt werden)

Behördenspezifische Hinweise:

München, 24/03/2015

Ort, Datum


Unterschrift Antragstellerin/Antragsteller


Unterschrift der verantwortlichen Leiterin/des verantwortlichen
Leiters des Vorhabens


Unterschrift der stellvertretenden Leiterin/des stellvertretenden
Leiters des Vorhabens


Kenntnisnahme der Tierschutzbeauftragten/des Tierschutzbeauftragten V)



Regierung von Oberbayern



Regierung von Oberbayern • 80534 München

persönlich/vertraulich
 Klinikum Großhadern
 Chirurgie, LMU München
 Herrn Dr. Joachim Andrassy o.V.i.A.
 Marchioninistr. 15
 81377 München

Bearbeitet (rechtlich) von Frau Teine	Telefon / Fax +49 (89) 2176-2014/ -402014	Zimmer 0405	E-Mail tierversuche@reg-ob.bayern.de
Bearbeitet (fachlich) von Frau Reymann Ihr Zeichen	Telefon / Fax +49 (89) 2176-2975/ -402975 Ihre Nachricht vom 24.03.2015	Zimmer 0417 Unser Geschäftszeichen 55.2-1-54-2532-80-2015	E-Mail tanya.reymann@reg-ob.bayern.de München, 15.12.2015

Tierschutzgesetz (TierSchG); Genehmigung von Tierversuchen

Anlagen:

- 1 Empfangsbekenntnis g.R.
- 1 Kostenrechnung
- 1 Merkblatt zur Kostenbegleichung

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Regierung von Oberbayern erlässt folgenden

Bescheid:

1. Der Tierversuch mit dem Titel „Rolle des Cathepsin S für die Alloimmunität nach Aorta-, Herz- und Nierentransplantation“
 - Leiter/-in: Dr. Joachim Andrassy
 - Stellvertreter/-in: Dr. Michael Thomas
 - Tierschutzbeauftragte/-r: Prof. Dr. Georg Enders
 - Tierzahl/Tierart: 566 Mäuse

Briefanschrift

Maximilianstraße 39
 80538 München

U4/U5 Lehel
 Tram 17/19 Maxmonument

Telefon Vermittlung

+49 (89) 2176-0

Telefax

+49 (89) 2176-2914

E-Mail

poststelle@reg-ob.bayern.de

Internet

www.regierung-oberbayern.de



- Dauer: 15.12.2015 bis einschließlich
31.12.2020

- Haltungsort: Institut für Chirurgische Forschung
Walter-Brendel-Zentrum
Marchioninstr. 27
81377 München

- Durchführungsor: Institut für Chirurgische Forschung
Walter-Brendel-Zentrum
Marchioninstr. 27
81377 München

wird gemäß Ihrem Antrag vom 24.03.2015 genehmigt. Ihr Antrag ist Bestandteil dieses Bescheides.

2. Folgende Personen sind berechtigt am o.g. Tierversuch mitzuarbeiten:

- Moritz Drefs
- Benjamin Ehle
- Anne Tischer

Frau Ines Nachtigall darf auf Grund Ihrer Ausbildung als BTA keine Narkosen durchführen.

3. Die Belastung wurde prospektiv mit schwer eingestuft.

4. Die Tierkörper werden als Material der Kategorie 1 gem. Artikel 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 eingestuft und sind nach den Vorgaben des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsrechts zu entsorgen.

5. Es werden folgende Nebenbestimmungen verfügt:

- a. Nach dem Abschluss des Versuchsvorhabens wird dieses durch die Regierung von Oberbayern gem. § 35 Abs. 1 TierSchVersV bewertet.
- b. Hierfür ist spätestens 4 Wochen nach Abschluss des Versuchsvorhabens die Beendigung des Versuchsvorhabens der Regierung von Oberbayern mitzuteilen. Dabei ist ein Abschlussbericht über die Ergebnisse vorzulegen. Der Abschlussbericht hat insbesondere auch Informationen über die in § 35 Abs. 2 Nrn. 1 bis einschließlich 5 TierSchVersV genannten Punkte zu enthalten.



Regierung von Oberbayern • 80534 München

persönlich/vertraulich
Klinikum Großhadern
Chirurgie, LMU München
Herrn Dr. Joachim Andrassy o.V.i.A.
Marchioninstr. 15
81377 München

Bearbeitet (rechtlich) von Frau Teine	Telefon / Fax +49 (89) 2176-2014 / -402014	Zimmer 0405	E-Mail tierversuche@reg-ob.bayern.de
Bearbeitet (fachlich) von Frau Reymann Ihr Zeichen	Telefon / Fax +49 (89) 2176-2975 / -402975 Ihre Nachricht vom 24.03.2015	Zimmer 0417 Unser Geschäftszeichen 55.2-1-54-2532-80-2015	E-Mail tanya.reymann@reg-ob.bayern.de München, 15.12.2015

Tierschutzgesetz (TierSchG); Genehmigung von Tierversuchen

Anlagen:

- 1 Empfangsbekenntnis g.R.
- 1 Kostenrechnung
- 1 Merkblatt zur Kostenbegleichung

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Regierung von Oberbayern erlässt folgenden

Bescheid:

- Der Tierversuch mit dem Titel „Rolle des Cathepsin S für die Alloimmunität nach Aorta-, Herz- und Nierentransplantation“
 - Leiter/-in: Dr. Joachim Andrassy
 - Stellvertreter/-in: Dr. Michael Thomas
 - Tierschutzbeauftragte/-r: Prof. Dr. Georg Enders
 - Tierzahl/Tierart: 566 Mäuse

Briefanschrift
Maximilianstraße 39
80538 München

U4/U5 Lehel
Tram 17/19 Maxmonument

Telefon Vermittlung
+49 (89) 2176-0

Telefax
+49 (89) 2176-2914

E-Mail
poststelle@reg-ob.bayern.de

Internet
www.regierung-oberbayern.de



- Dauer: 15.12.2015 bis einschließlich
31.12.2020

- Haltungsort: Institut für Chirurgische Forschung
Walter-Brendel-Zentrum
Marchioninstr. 27
81377 München

- Durchführungsor: Institut für Chirurgische Forschung
Walter-Brendel-Zentrum
Marchioninstr. 27
81377 München

wird gemäß Ihrem Antrag vom 24.03.2015 genehmigt. Ihr Antrag ist Bestandteil dieses Bescheides.

2. Folgende Personen sind berechtigt am o.g. Tierversuch mitzuarbeiten:

- Moritz Drefs
- Benjamin Ehle
- Anne Tischer

Frau Ines Nachtigall darf auf Grund Ihrer Ausbildung als BTA keine Narkosen durchführen.

3. Die Belastung wurde prospektiv mit schwer eingestuft.

4. Die Tierkörper werden als Material der Kategorie 1 gem. Artikel 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 eingestuft und sind nach den Vorgaben des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsrechts zu entsorgen.

5. Es werden folgende Nebenbestimmungen verfügt:

- a. Nach dem Abschluss des Versuchsvorhabens wird dieses durch die Regierung von Oberbayern gem. § 35 Abs. 1 TierSchVersV bewertet.
- b. Hierfür ist spätestens 4 Wochen nach Abschluss des Versuchsvorhabens die Beendigung des Versuchsvorhabens der Regierung von Oberbayern mitzuteilen. Dabei ist ein Abschlussbericht über die Ergebnisse vorzulegen. Der Abschlussbericht hat insbesondere auch Informationen über die in § 35 Abs. 2 Nrn. 1 bis einschließlich 5 TierSchVersV genannten Punkte zu enthalten.

- c. Über die Tierversuche sind Aufzeichnungen zu führen. Die Aufzeichnungen müssen den mit dem Versuchsvorhaben verfolgten Zweck, sowie die Zahl und Art der verwendeten Tiere und die Art und Durchführung der Versuche, sowie die Namen der Personen, die die Tierversuche durchgeführt haben, angeben. Außerdem ist bei Wirbeltieren die Herkunft einschließlich des Namens und der Anschrift des Vorbesitzers anzugeben. Die Aufzeichnungen sind von den Personen, die die Versuche durchgeführt haben, und von dem Leiter des Versuchsvorhabens, oder seinem Stellvertreter zu unterzeichnen; werden die Aufzeichnungen elektronisch erstellt, sind sie unverzüglich nach Abschluss jedes Teilversuchs des Versuchsvorhabens auszudrucken und von dem Leiter des Versuchsvorhabens oder seinem Stellvertreter zu unterzeichnen. Die Aufzeichnungen sind fünf Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und der zuständigen Behörde auf Verlangen vorzulegen.
- d. Diese Genehmigung kann jederzeit ganz oder teilweise wiederrufen werden.

6. Der Antragsteller trägt die Kosten des Verfahrens.

7. Für diesen Bescheid wird eine Gebühr in Höhe von 500,00 € festgesetzt.
Die Auslagen betragen 27,88 €.

Gründe:

I.

Mit Datum vom 24.03.2015, eingegangen am 08.05.2015 stellten Sie bei der Regierung von Oberbayern einen Antrag auf Genehmigung eines Tierversuches „Rolle des Cathepsin S für die Alloimmunität nach Aorta-, Herz- und Nierentransplantation“. Ihr Antrag wurde am 04.11.2015 von der Kommission nach § 15 Abs. 1 TierSchG beraten und befürwortet.

II.

1. Die Regierung von Oberbayern ist zur Entscheidung über den Antrag auf Erteilung der Genehmigung sachlich und örtlich zuständig (§ 15 TierSchG i.V.m. § 1 Abs. 2 Spiegelstrich 1 Verordnung zum Vollzug tierschutzrechtlicher Vorschriften –TierSchRVV-, Art. 3 Abs. 1 Nr. 2 Bayer. Verwaltungsverfahrensgesetz –BayVwVfG-).

Die Regierung von Oberbayern ist zur Einstufung der tierischen Nebenprodukte als Kategorie 1 nach Artikel 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 zuständig (§ 3 Abs. 2 der Verordnung über Zuständigkeiten zum Vollzug des Rechts der Beseitigung tierischer Nebenprodukte – ZustVTierNebG).

2. Rechtsgrundlage für den Erlass dieses Bescheides ist § 8 TierSchG. Nach § 8 Abs. 1 TierSchG sind Versuche an Wirbeltieren genehmigungspflichtig. Die Genehmigung ist zu erteilen, da die Genehmigungsvoraussetzungen gem. § 8 Abs. 1 Satz 2 TierSchG erfüllt sind.
3. Die Einstufung in Kategorie 1 war erforderlich, da diese Tiere oder deren Körperteile infolge dieses Verfahrens/dieser Verfahren schwerwiegende Gesundheitsrisiken für Menschen und andere Tiere darstellen können (Art. 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009).
4. Die Rückblickende Bewertung ist vorzunehmen, da das Versuchsvorhaben nach Artikel 15 Absatz 1 in Verbindung mit Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU als „schwer“ eingestuft wird.
5. Rechtsgrundlage für die Nebenbestimmungen ist Art. 36 Abs. 2 Nr. 3 (Widerufsvorbehalt) und Nr. 4 (Auflagen) BayVwVfG i.V.m. §§ 29 und 35 TierSchVersV, § 1 Abs. 1 und Abs. 2 Versuchstiermeldeverordnung –VersTierMeldV-. Sie sind erforderlich, um die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes bei der Durchführung der genehmigten Versuche zu sichern.

6. Die Kostenentscheidung beruht auf Art. 1, 2 Abs. 1 Satz 1, Art. 6 Abs. 1 Satz 1 i.V.m. Abs. 2 Satz 1 des Kostengesetzes –KG-.

Die Entscheidung hinsichtlich der Gebührenbemessung beruht auf Art. 6 Abs. 1 Satz 1 KG in Verbindung mit der Tarifstelle 7.IX.10/2.2 des Kostenverzeichnisses –KVz-. Demnach bemisst sich die Gebühr für die Genehmigung nach § 8 TierSchG im Rahmen zwischen 100,- € und 1.000,- €. Die Festsetzung von 500,- € entspricht dem entstandenen Verwaltungsaufwand. Die Auslagen sind Sitzungsentschädigungs- und Reisekostenvergütungen.

Hinweise

- Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 16 Abs. 1 Sätze 1 bis einschließlich 3 TierSchVersV nicht erfüllen, dürfen erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gemäß § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV bzw. nach Vorlage der Nachweise der erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten eingesetzt werden.
- Ein Wechsel der Leitung oder der stellvertretenden Leitung ist der Regierung von Oberbayern unverzüglich anzuzeigen, § 34 Abs. 2 Satz 1 TierSchVersV.
- Bei Verstößen gegen diese Genehmigung bzw. die darin enthaltenen Nebenbestimmungen behalten wir uns die Einleitung eines Ordnungswidrigkeitenverfahrens vor, in dem auch Bußgelder verhängt werden können. Dies gilt insbesondere bei Nichteinhaltung der genehmigten Versuchsdauer.
- Auf die Aufbewahrungspflicht gemäß § 40 TierSchVersV weisen wir hin.
- Ein Tierversuchsantrag, der mit weniger als fünf Jahren genehmigt wurde, kann gemäß § 33 Abs. 2 TierSchVersV nur zweimal um jeweils 1 Jahr verlängert werden, sofern dadurch die Gesamtdauer des genehmigten Versuchsvorhabens fünf Jahre nicht überschreitet und sofern seit der erstmaligen Erteilung oder ersten Verlängerung der Genehmigung keine Änderungen des genehmigten Versuchsvorhabens oder nur solche Änderungen eingetreten sind, die 1. nach § 34 Abs. 1 Satz 1 Nr. 4 oder Abs. 2 Satz 1 TierSchVersV angezeigt und von der zuständigen Behörde nicht beanstandet oder 2. nach § 34 Abs. 3 TierSchVersV genehmigt worden sind.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid können Sie Klage erheben. Die Klage müssen Sie innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe dieses Bescheides beim Bayerischen Verwaltungsgericht München, Bayerstraße 30, 80335 München (Postanschrift: Postfach 20 05 43, 80005 München), schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle dieses Gerichts erheben. In der Klage müssen Sie den Kläger, den Beklagten (Freistaat Bayern) und den Gegenstand des Klagebegehrens bezeichnen, ferner sollen Sie einen bestimmten Antrag stellen und die zur Begründung dienenden Tatsachen und Beweismittel angeben. Der Klageschift sollen Sie diesen Bescheid beifügen (in Urschrift, in Abschrift oder in Ablichtung), ferner zwei Abschriften oder Ablichtungen der Klageschift für die übrigen Beteiligten.

Hinweise zur Rechtsbehelfsbelehrung

- Die Klageerhebung in elektronischer Form (z. B. durch E-Mail) ist unzulässig.
- Kraft Bundesrechts ist bei Prozessverfahren vor den Verwaltungsgerichten grundsätzlich ein Gebührenvorschuss zu entrichten.

Mit freundlichen Grüßen

Teine