

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie nov. 2005

Herziene versie**DECNR:** [REDACTED]**Ontvangen: 29-03-2011**

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

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			Skeletspier metabolisme
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	----------------------------

Financieel beheerder	[REDACTED]
-------------------------	------------

Budgetnummer	[REDACTED]
--------------	------------

Titel van het onderzoek:

Heeft metformine een verlagende werking op de zuurstofverzadiging in het bloed naast zijn remmende werking op complex I van de mitochondriële respiratie in de diabete skeletspier?

startdatum **01-mei-2011** einddatum ⁹ **01-sept-2013** Duur van de proef ¹⁰: 4 weken

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegd- heid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	Art.9	[REDACTED]
2. Vervanger VO (VVO)	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	Art.9	[REDACTED]
3. Verantwoorde- lijk medewerker (VM) GGO ⁷	nvt				
4. overige uitvoerenden	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	Art.12	[REDACTED]
5. Principal investigator	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	Art.9	[REDACTED]

Diergroep	1	2	3	4	5		
ctrl/exp/sham	exp	exp	ctrl	ctrl	ctrl		
Diersoort	02	02	02	02	02		
Stam	ZDF fa/fa	ZDF fa/+	ZDF fa/fa	ZDF fa/+	Wistar		
Construct / mutatie ?	nee	nee	nee	nee	nee		
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02		
Aantal	30	30	10	10	2		
Geslacht	man	man	man	man	man		
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja	ja	ja/nee ⁸	ja/nee ⁸
Leeftijd/gewicht	11 weken	11 weken	11 weken	11 weken	11 weken		
Doel van de proef *	33	33	33	33	33		
Belang van de proef *	01	01	01	01	01		
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01		
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01		
Anesthesie *	04	04	04	04	04		
Pijnbestrijding *	04	04	04	04	04		
Mate ongerief *	03	03	03	03	03		
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01		

* VHI-coderingen zie bijlage

[Redacted]

Aan:

S
[Redacted] 20081108

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

Datum
29 maart 2011

Contact

[Redacted]
[Redacted]

Geachte,

Bij deze stuur ik U een toelichting op mijn gewijzigd DEC-voorstel [Redacted]
[Redacted] *"Heeft metformine een verlagende werking op de zuurstofverzadiging in het bloed naast zijn remmende werking op complex I van de mitochondriële respiratie in de diabete skeletspier?"*

De eerste drie punten zijn aangepast in het bijgevoegde voorstel en bij punt 10a heb ik de toelichting laten staan bij de tabel om mijn motivatie te verduidelijken. De laatste vraag betreft of het mogelijk is om metformine aan het drinkwater toevoegen en dat is praktisch natuurlijk wel mogelijk. Alleen hebben we hier niet voor gekozen omdat we bij de voorgaande studie de hoeveelheid drinkwater niet hebben geregistreerd. Maar wat wel opviel is dat de diabete ZDF ratten beduidend meer water drinken dan de gezonde ZDF ratten. Bovendien leek voornamelijk bij de diabete dieren dat het waterverbruik verschillend was tussen de kooien. Aangezien we in deze studie het effect van de dosering willen bestuderen is het erg belangrijk dat deze heel nauwkeurig is. In een andere studie merkten we dat onnauwkeurige dosering een grotere spreiding dan verwacht in de resultaten opleverden. Bovendien zou het toedienen via drinkwater betekenen dat ik de ratten geïsoleerd zou moeten huisvesten om de exacte dosering te weten wat mijns inziens veel meer stress oplevert dan het oraal doseren. Bij deze hoop ik uw vragen voldoende beantwoord te hebben.

Hoogachtend,

[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]

1 verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. nov. '05)

Titel: Heeft metformine een verlagende werking op de zuurstofverzadiging in het bloed naast zijn remmende werking op complex I van de mitochondriële respiratie in de diabete skeletspier?

1. Doel van de proef.

Metformine is een medicijn dat in veel gevallen wordt voorgeschreven aan patiënten met type 2 diabetes en is tevens wereldwijd een van de meest voorgeschreven medicijnen. De werking van metformine is vooral gericht op het remmen van de productie van glucose in de lever (gluconeogenese).

Het is al bekend dat metformine de cellulaire respiratie beperkt door complex I van de oxidatieve fosforylering te remmen. In literatuur is men het erover eens dat dit remmende effect van metformine op complex I minimaal is en dat dit op functioneel niveau niet of nauwelijks van belang zou zijn. Deze conclusies zijn echter gebaseerd op experimenten die alleen *in vitro* zijn uitgevoerd terwijl er weinig bekend is over het effect op mitochondriële functie *in vivo*. Vandaar dat we in een voorgaande studie *in vivo* het effect van metformine op de mitochondriële functie van de intacte skeletspier bepaald hebben.

Aangezien de dosis metformine van 300 mg/kg/dag die gebruikt is in deze studie hoger is dan patiënten voorgeschreven krijgen willen we de effecten van metformine op *in vivo* mitochondriële functie bij verschillende dosissen bestuderen.

Recente studies hebben verder aangetoond dat metformine een vitamine B12 deficiëntie tot gevolg kan hebben wat weer tot anemie leidt. Aangezien we dit in de voorgaande studie niet bepaald hebben, willen we dit in deze follow-up studie onderzoeken door het hemoglobine gehalte in het bloed met een hemometer te meten. Bovendien willen we de zuurstofverzadiging in het bloed monitoren tijdens het metabole herstel van de spier na stimulatie

en O₂-toevoer na inspanning van de skeletspier.

Het doel van deze studie is dus om de relatie tussen *in vivo* mitochondriële functie in de skeletspier en de dosis metformine te onderzoeken. Bovendien om extra inzicht te verkrijgen in de oorzaak van de afname van de zuurstofverzadiging in het bloed tijdens de inspanning. Het bloedvolume en O₂-hemoglobine verzadiging gemeten worden in de skeletspier.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Diabetes is een ziekte die in de westerse samenleving epidemische proporties begint aan te nemen. Momenteel lijden ongeveer 246 miljoen mensen aan deze aandoening en verwacht wordt dat dit cijfer gaat stijgen tot ongeveer 380 miljoen in 2025. Van het totaal aantal diabetes patiënten lijdt ongeveer 85-95% aan type 2 diabetes.

Aan de meeste type 2 diabetes patiënten wordt metformine voorgeschreven en metformine is een van de meest voorgeschreven medicijnen wereldwijd. Mogelijke schadelijke effecten van deze medicijnen op de skeletspier zouden dus zeker meegewogen moeten worden bij het voorschrijven ervan.

3. Alternatieven

Een mogelijk alternatief is mens- en/of gezonde mensgebonden onderzoek. Type 2 diabetes patiënten hebben vaak een sterk wisselende presentatie van de ziekte. Leeftijd, BMI en activiteitsniveau zijn erg moeilijk te matchen. Bovendien is het niet mogelijk om diabetes patiënten te vinden die nooit metformine voorgeschreven hebben gekregen. Deze factoren hebben een grote invloed op de te onderzoeken parameters.

De *in vitro* mitochondriële functie analyse van het spierweefsel vereist het nemen van spierbipten. Voor het betrouwbaar bepalen van *in vitro* mitochondriële functie is het noodzakelijk de analyse uit te voeren over een groot gedeelte van de spier. Dit is in een humane studie het best te benaderen door het nemen van meerdere (>3) spierbipten op verschillende locaties en dit is een grote belasting voor de proefpersoon.

Studies over remmende werking van metformine op mitochondriële respiratie zijn in beperkte mate eerder verricht in cellijnen. Een cellijn geeft echter een slechte maat voor de mitochondriële functie in een intacte werkende spier *in vivo*.

Met behulp van ^{31}P MRS spectroscopie is het wel mogelijk *in vivo* en non-invasief de mitochondriële functie in de skeletspier te bepalen. De ontwikkeling van type 2 diabetes bij de ZDF *fa/fa* rat is heel vergelijkbaar met het verloop bij mensen en daarom is dit type rat ideaal om de ontwikkeling van type 2 diabetes te bestuderen.

Door *in vivo* ^{31}P MRS spectroscopie [REDACTED] metingen van *in vitro* parameters kan het effect van metformine op de functionele capaciteit van de skeletspier nauwkeurig bepaald worden.

4. Ethische afweging

Beter inzicht in de werking van metformine kan van essentieel belang zijn bij de behandeling van type 2 diabetes of het voorkomen hiervan. Deze medicijnen worden al tientallen jaren wereldwijd voorgeschreven maar over de effectieve werking is erg weinig bekend. Aangezien metformine wereldwijd een van de meest voorgeschreven medicijnen is en het grote effect van metformine op spierfunctie waargenomen in een voorgaande studie, weegt het verkrijgen van deze fundamentele kennis op tegen het matig ongerief dat de gebruikte proefdieren ondervinden.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De laatste jaren is er veel discussie over de werking en het gebruik van anti-diabetica zoals metformine. Metformine wordt in veel gevallen voorgeschreven aan patiënten met type 2 diabetes. Er is consensus over het feit dat de anti-diabetische werking van metformine primair gebaseerd is op het remmen van glucose productie van de lever. Ook zijn alle studies het erover eens dat in de skeletspier metformine via complex I de oxidatieve fosforylering remt waardoor de productie van ATP (de universele energiedrager in biologische organismen) wordt verminderd. Er is echter nog weinig onderzoek gedaan naar het effect van metformine op de mitochondriële functie in de intacte skeletspier.

Eerdere studies demonstreren dat metformine specifiek invloed heeft op de werking van de oxidatieve fosforylering in geïsoleerde mitochondriën [1-3]. In één studie is *in vivo* bij gezonde proefpersonen onderzocht wat het effect is van metformine [8]. De studie toont aan dat er een significante daling is in de maximale zuurstof opname capaciteit (VO_2) bij gezonde mensen na het gebruik van metformine. Zelf geven de onderzoekers echter al aan dat het moeilijk is om met de gebruikte studieopzet te bepalen of dit effect op functioneel niveau significant is en of de oorzaak ligt in de skeletspier of in het functioneren van het hart. Aangezien $VO_{2,max}$ een maat voor zuurstof gebruik is van het hele lichaam is het moeilijk te zeggen wat er gebeurt op het niveau van de mitochondriën.

Met behulp van ^{31}P MRS spectroscopie hebben wij *in vivo* het functioneren van de skeletspier bestudeerd na inspanning () bij zowel gezonde als diabete ratten na behandeling met metformine. ()

() Bij een dosis van 100 mg/kg werden vergelijkbare plasmawaarden metformine gevonden als in humane studies, terwijl 30 mg/kg ongeveer de dosis is die bij diabetes patiënten wordt toegediend. Het is bekend dat ratten een relatief hogere dosis nodig hebben voor vergelijkbare plasmawaarden als mensen [1]. ()

() Uit eerdere studies blijkt dat behandeling met metformine kan leiden tot een vitamine B12 tekort [4] zowel bij kort als langdurig gebruik. Aangezien vitamine B12 deficiëntie leidt tot bloedarmoede willen we met hetzelfde stimulatieprotocol dat gebruikt wordt om mitochondriële functie in de skeletspier te meten het BOLD-effect met functionele MRI bestuderen. Met BOLD MRI kan de zuurstofsaturatie en het bloedvolume in de spier bepaald worden [5]. Duidelijkheid hierover geeft een meer volledig beeld van zuurstof toevoer en verbruik tijdens en na stimulatie van de skeletspier *in vivo*. Deze kennis zou kunnen verklaren waarom we *in vivo* zo'n sterk remmende werking van metformine op de mitochondriële functie zagen. Dit kan van essentieel belang zijn bij het bepalen van een therapie strategie bij type 2 diabetes.

Omdat het verloop van type 2 diabetes bij ZDF *fa/fa* ratten heel vergelijkbaar is met de ontwikkeling van type 2 diabetes bij mensen is gekozen om dit diermodel te gebruiken voor dit onderzoek.

6. Wetenschappelijke beoordeling

De onderzoekslijn wordt gefinancierd uit het (). Het project is door de principal investigator op zijn wetenschappelijke en maatschappelijke merites beoordeeld en akkoord bevonden.

4 proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species en gewenste stam: ZDF *fa/fa* ratten.

De ZDF *fa/fa* rat is uitermate geschikt als model voor type 2 diabetes. De *fa* mutatie zorgt voor een verkorting van de leptine receptor dat leidt tot insuline resistentie. *fa/fa* ZDF ratten worden obees en ontwikkelen hyperlipidemie en hyperglycemie. De leeftijd van de ratten ten tijde van het begin van de studie zal 11 weken zijn. Bij een leeftijd van 12 weken zijn de ratten diabeet en begint de behandeling met metformine. De ratten worden gemeten op een leeftijd van 14 weken.

Herkomst: De dieren worden geleverd door het bedrijf Charles River.

Uiteindelijke bestemming: Na de experimenten zullen de dieren worden opgeofferd waarna het hart, lever, nieren en skeletspieren worden gebruikt voor *in vitro* metingen van mitochondriële functie en histologische bepalingen.

7b. Sexe

Er is gekozen om enkel mannelijke dieren te gebruiken. Het ontstaan en verloop van type 2 diabetes in de ZDF *fa/fa* is niet voor beide geslachten hetzelfde. De ontwikkeling van type 2 diabetes is het snelst en het best voorspelbaar in de mannelijke ZDF *fa/fa*. Daarom kiezen we ervoor om de steekproeven te beperken tot 1 geslacht nl. mannelijk.

7c. Aantallen

Van de verschillende technieken die worden toegepast is de bepaling van BOLD-effect gemeten met MRI na inspanning de minst gevoelige. In skeletspier is deze techniek minder gevoelig dan in bijvoorbeeld de hersenen omdat de spieren minder doorbloed zijn. In literatuur worden standaard deviaties van het BOLD signaal gevonden van ongeveer 15%. Het beoogde effect na treatment met metformine wordt geschat op ongeveer 20% → $\delta = 20\%$

Om een effect δ van 20% te kunnen aantonen bij een power π van 80% is het aantal volgens de formule van L. Sachs: $n = 15.7 * (15/20)^2 = 8.8$

De uitval in de vorige, qua meetmethodes betreft gelijksoortige studie was laag, namelijk 7%.

Steekproefgrootte $n = 8.8 / 0.93 = 9.5 = 10$ per groep

Er zijn 2 Wistar ratten als pilot-experiment toegevoegd omdat de gebruikte BOLD metingen op de skeletspier in ratten nog niet eerder zijn uitgevoerd in deze groep. Deze willen we 3x onder anesthesie brengen en scannen om de BOLD metingen te optimaliseren en zo het aantal dieren te minimaliseren.

Aantal dieren per experimentgroep

Dosis (mg/kg/dag)	0	30	100	300
ZDF <i>fa/+</i>	10	10	10	10
ZDF <i>fa/fa</i>	10	10	10	10

Pilot: 2 Wistar ratten

Totaal aantal dieren: 82

5 dierproef

8. Experiment

Omdat het verloop van type 2 diabetes bij ZDF *fa/fa* ratten heel vergelijkbaar is met de ontwikkeling van type 2 diabetes bij mensen is gekozen om dit diermodel te gebruiken voor dit onderzoek. De proefdieren krijgen twee weken lang metformine toegediend en daarna wordt de skeletspierfunctie van deze dieren vergeleken met een controle groep. Metformine heeft een halfwaardetijd van 4 uur in bloedplasma bij ratten waarbij een hogere concentratie in de lever waargenomen wordt vergeleken met de plasma concentratie [6].

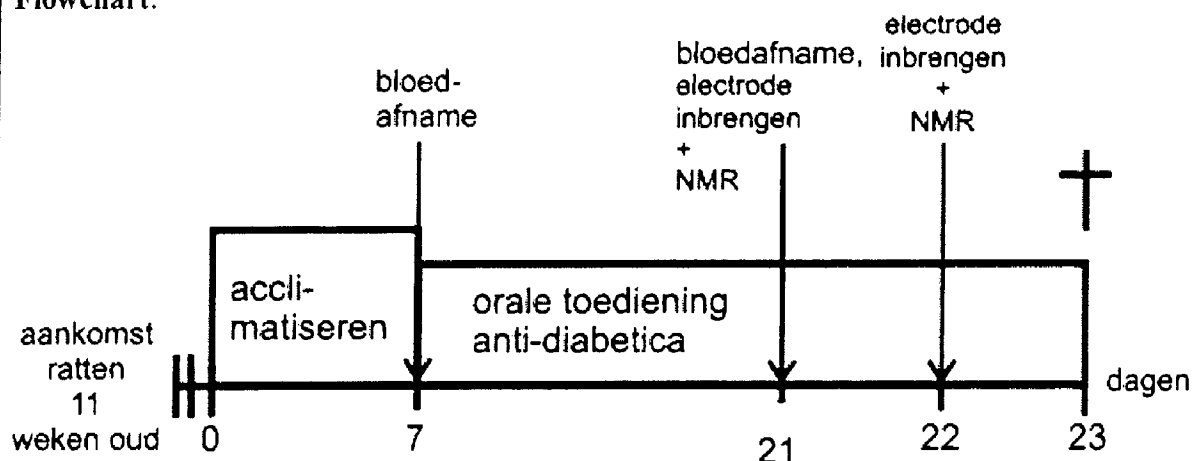
[REDACTED], zijn er een experimentgroep met- en zonder type 2 diabetes opgenomen in dit DEC-voorstel.

De eerste doelstelling van dit experiment is om te kwantificeren wat het effect van de dosis metformine is op de functie van de intacte skeletspier. Aangezien metformine door diabetes patiënten oraal wordt ingenomen zal dit ook bij de proefdieren oraal gebeuren. De ratten zijn bij aankomst 11 weken oud en de ZDF *fa/fa* ratten hebben dan type 2 diabetes. De proefdieren krijgen na aankomst een week om te acclimatiseren in de nieuwe leefruimte. Net voordat begonnen wordt met het toedienen van de medicijnen zal 100 µl bloed worden afgenomen via de *vena saphena* (zie SOP CPV-3-MR) voor een nulbepaling van het glucose- en insulinegehalte. Vervolgens krijgen de proefdieren van de metformine groep dagelijks via een orale doseercanule, de betreffende dosis metformine (30, 100 of 300 mg/kg) opgelost in 1 ml water toegediend (ZDF ratten van 250-300 g) middels SOP4. De controle groep krijgt 1 ml water via een orale doseercanule toegediend. Na 2 weken metformine toegediend te krijgen, dus 3 weken na aankomst in het diervverblijf op [REDACTED] worden *in vivo* MR metingen uitgevoerd (SOP 2).

Voor de MR scanner-sessie wordt het dier onder anesthesie gebracht (inductiekamer met isofluraan/ medische lucht mengsel). Door middel van kleine incisies in de huid, worden de elektrodes subcutaan in de poot geplaatst en aangesloten op de stimulator (SOP 1). Deze methode is weinig invasief, waardoor het ongerief, hierdoor veroorzaakt, minimaal is. De rat wordt in de MR opstelling geplaatst met de *Tibialis Anterior* ter hoogte van de RF-spoel. Tijdens de MR meting wordt de *Tibialis Anterior* gedurende maximaal 5 minuten gestimuleerd, waarna de spier kan herstellen van de inspanning (10 minuten). Na het beëindigen van de MR meting worden de elektrode-uiteinden verwijderd, de huid gehecht en kan het dier bijkomen in een "recovery chamber". Een typische MR-sessie zal maximaal 4 uur duren. Omdat het vanwege de lange duur waarschijnlijk niet mogelijk is om in 1 sessie zowel het metabole herstel en BOLD te meten zullen indien nodig 1 dag na de MRS sessie de dieren opnieuw onder narcose gebracht worden en met dezelfde procedure als voor ³¹P MRS in de scanner gebracht worden (alleen zal het andere pootje voor stimulatie gebruikt worden). De dag erna worden de dieren onder anesthesie (inductiekamer met isofluraan/ medische lucht mengsel) inclusief analgesie opgeofferd d.m.v. het verbloeden via de *vena cava inferior* (SOP 3) waarna de *Tibialis Anterior* en andere weefsels zullen worden verzameld voor verdere *in vitro* metingen.

Er is gekozen om de MR-sessie en het opofferen van de rat voor de *in vitro* metingen op verschillende dagen te doen. De reden hiervoor is dat voor een aantal van de geplande *in vitro* metingen (geïsoleerde mitochondriën studies) het weefsel niet ingevroren kan worden, maar direct gebruikt moet worden. Het plannen van deze *in vitro* metingen en de MR experimenten op 1 dag is vanwege de beschikbare tijd niet mogelijk.

De pilotdieren worden een 3^e keer onder anesthesie gebracht om het BOLD MRI scan protocol te implementeren met een minimaal aantal ratten.

Flowchart:**9. Experimentele condities****9a. Anesthesie**

Aanbrengen elektrode: De ratten worden verdoofd via ademhalingsanesthesie: de rat wordt in plexiglas inductiekamer geplaatst waarin het mengsel van medische lucht, O₂ (0.40 L/min en 0.2 L/min resp.) en isofluraan wordt aangevoerd. Na de inleiding (3.5 vol% isofluraan) wordt de rat in de opstelling gelegd en gebeurt het onderhouden van dezelfde anesthesie via een ademhalingskapje (begin proef 2 vol% isofluraan, einde experiment 1-1.5 vol%).

MR meting: Hiervoor wordt dezelfde 'onderhoud methode' gebruikt als voor het aanbrengen van de elektrode plaatsvindt. Tijdens de meting zal de zuurstofsaturatie van het bloed gecontroleerd worden met behulp van een Finapres. Opoffering wordt toegepast d.m.v. het verbloeden via de *vena cava caudalis* onder anesthesie en analgesie (Temgesic).

9b. Pijnbestrijding

Er wordt geen additionele pijnbestrijding gebruikt voor het inbrengen van de subcutane elektrode, omdat deze methode reeds eerder gebruikt is en bekend is dat pijnbestrijding niet noodzakelijk is. Het plaatsen van de elektrode is minimaal invasief en bij een vervolgmeting bij dezelfde ratten bleek dat het spiermetabolisme niet veranderd was. Dit wijst erop dat er alleen wat schade aan de huid was en niet aan de spier. Na ontwaken uit de anesthesie vertonen de proefdieren normaal gedrag qua eten, manier van bewegen en sociaal gedrag (beoordeeld door de dagelijkse onderzoeker). Bij afwijkend gedrag wordt het advies van de biotechnicus van het CPV gevraagd. Bij het opofferen wordt een Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie voor pijnbestrijding 15 min pre-op gegeven.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Alle ratten worden een dag na [redacted] meting onder volledige anesthesie en analgesie geëuthanaseerd door middel van verbloeding (SOP3).
- Indien de dieren gedurende huisvesting abnormale gedragsverandering (niet meer eten/drinken) of sterke gewichtsafname (>15%) vertonen, wordt in overleg met de art.12 functionaris besloten of een dier geëuthanaseerd moet worden.

10a. Ongerief

Handeling	Frequentie	Duur	Aard	ongerief
Bloedafname	2x	5 min	korte prik	02
Orale dosering	14x	1 min	lichte stress	02
Elektrode implanteren	2x (3x*)	20 min	Subcutane incisie	02
Ontwaken uit anesthesie	2x (3x*)	5 min	stress	02
Totaal				03

* Alleen voor pilot dieren

Het ongerief als gevolg van het implanteren van de elektrode wordt geschat op 02. De MR scannersessies worden als matig ongerief geschat, op basis van eerder door ons uitgevoerde studies. De gebruikte anesthesiemethode zorgt dat de dieren, zelfs na lange sessies (bijv. 4 uur), snel ontwaken (binnen 5 minuten). Het ongerief van het ontwaken uit anesthesie wordt daarom geschat op 02.

Uit ervaring blijkt dat de ratten erg snel aan de orale dosering wennen, daarom wordt het ongerief voor de orale doseercanule geschat op 02. Vooraf de start van de experimenten laten we de dieren gewennen aan het fixeren en de doseercanule. Alle handelingen bij elkaar lijkt het ongerief ons wat hoger vandaar dat we het totale ongerief schatten op 03.

10b. Welzijnsevaluatie

De metingen komen gedeeltelijk overeen met eerdere studies (DEG). Het effect van deze metingen staan hierboven beschreven en komen erop neer dat de ratten weinig ongerief ondervinden van het implanteren/verwijderen van de elektrode, de MRS studie en het ontwaken uit anesthesie na de dynamische ³¹P MRS metingen. De dieren worden regelmatig gewogen en dat is ook een maat voor de mate van ongerief van de dieren.

11. Verzorging en huisvesting

De ratten worden in verrijkte kooitjes per twee gehuisvest in de [redacted] aan de [redacted]. Alle beschreven experimenten worden in het [redacted] uitgevoerd. De dieren worden wekelijks gewogen. Extra aandacht is vereist voor wat betreft het voer: de ZDF ratten moeten met een dieet voer gevoerd worden (Purina 5008).

12. Deskundigheid

De deskundigheid binnen de [redacted] groep van [redacted] ligt bij de VO in samenwerking met de VVO en 3 medewerkers van het CPV (art. 12), aanwezig op de [redacted]. In geval van calamiteiten zal de art. 14 functionaris geconsulteerd worden.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage

Relevante literatuur

1. Owen, M.R. and A.P. Halestrap, *The mechanisms by which mild respiratory chain inhibitors inhibit hepatic gluconeogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1142(1-2): p. 11-22.
2. Brunmair, B., et al., *Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?* *Diabetes*, 2004. 53(4): p. 1052-9.
3. Carvalho, C., et al., *Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment*. *Mol*

- Cell Biochem*, 2008. **308**(1-2): p. 75-83.
4. de Jager, J., et al., Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ*, 2010. **340**: p. c2181.
 5. Damon, B.M., et al., Dual gradient-echo MRI of post-contraction changes in skeletal muscle blood volume and oxygenation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2007. **57**(4): p. 670-679.
 6. Wilcock, C., N.D. Wyre, and C.J. Bailey, Subcellular distribution of metformin in rat liver. *J Pharm Pharmacol*, 1991. **43**(6): p. 442-4.

Bijlage 1

SOP1: aanbrengen subcutane elektrostimulatie-elektrode

- Algehele anesthesie met behulp van isofluraan op medische lucht (0.60 L/min) De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van het ooglid- en tussenteenreflex.
- Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de rat gepositioneerd wordt.
- De ogen worden bevochtigd met oogzalf
- De operatie wordt a-septisch uitgevoerd, alle benodigde instrumenten worden vooraf ge-autoclaveerd, net als de te implanteren elektrode.
- De vacht in het laterale deel van de achterpoot wordt geschoren. De huid wordt geschoren, gewassen en ontsmet met jodium tinctuur. [REDACTED]
[REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Met [REDACTED] wordt de werking van de elektrode getest: onbelast moet de voet krachtig naar het onderbeen toe bewegen.
- Wanneer de stimulatie kwalitatief goed is worden beide elektrodepolen vastgezet met 1 hechting.
- Na het beëindigen van het experiment waarvoor de elektrostimulatie nodig was worden de elektrodepolen verwijderd en beide incisies in de huid gehecht.

SOP 2: NMR meting in vivo in rat

- De rat wordt gewogen.
- De rat wordt in een plexiglas inductiekamer geplaatst die aangesloten wordt op de anesthesie aanvoerleiding. Dragergas: medische lucht (0.6 L/min): anesthesie: iso-fluraan
- Wanneer de rat voldoende onder anesthesie is, wordt het dier in de NMR-opstelling gelegd, op z'n rug, met het bovenlichaam op de verwarmde houder. De anesthesie wordt vanaf nu verstrekt via een ademhalingskapje. De elektrode wordt aangesloten op de stimulator.
- De sensors voor het monitoren van de fysiologische parameters worden aangebracht: een ballonnetje voor het meten van de ademhaling wordt op of onder de thorax geplaatst en de rectale thermometer wordt met behulp van glijmiddel ingebracht.
- De ogen worden bevochtigd met oogzalf.
- De dosering van de anesthesie tijdens de meting wordt gebaseerd op de ademhalingssnelheid: de duur tussen 2 ademhalingscycli wordt tussen 800 en 1200 ms gehouden.
- De rat wordt op zo'n manier gepositioneerd dat het te meten lichaamsdeel goed is gepositioneerd t.o.v. van de RF-spoel. Hierbij wordt de rat zacht gefixeerd met behulp van stukjes schuim.
- Tijdens de ^{31}P MRS en [REDACTED] wordt de Tibialis anterior gestimuleerd [REDACTED]
[REDACTED] Het contractieprotocol (pulstrein[REDACTED], [REDACTED] stimulatiefrequentie, [REDACTED]
[REDACTED] bestaat uit maximaal 5 minuten, contractie, gevolgd door 10 minuten herstel.
- Na de NMR sessie wordt de rat uit de scanner gehaald.
- De hechtinkjes over de elektrodes worden voorzichtig los geknipt en de elektrodes worden verwijderd.
- De incisies worden door middel van 1 of wanneer nodig 2 hechtingen gedicht (zie SOP 1).
- De rat wordt hierna van de anesthesie afgehaald en kan rustig bijkomen in een recovery chamber (+/- 30°C incl. extra zuurstof).

SOP 3: Opoffering onder anesthesie

- Rat onder IsoFlo-narcose (kapje)
- Testen oog- teenreflex
- Buik en Thorax ruim scheren
- Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie voor pijnbestrijding 15 min pre-op.
- Buik en Thorax ruim scheren
- Minimale huidincisie
- Huid zijdelings vrij prepareren
- Buik openen zodat diafragma zichtbaar is
- Ingewanden opzij leggen en *vena cava caudalis* aanprikken

SOP 4: Metformine toedienen met orale doseercanule

- Toedienen van metformine of gebeurt iedere middag op een vast tijdpunt.
- De rat wordt gewogen.
- Voor de ratten die metformine toegediend krijgen wordt 30, 150 of 300 mg/kg metformine opgelost in 1 ml water. Ratten van 250 g krijgen dus bijvoorbeeld 75 gram metformine opgelost in 1 ml water.
- Voor het inbrengen van de orale doseercanule worden de ratten met de hand gefixeerd.
- Na fixeren wordt de orale doseercanule via de mond in de slokdarm in gebracht en het medicijn opgelost in water wordt langzaam in de maag gespoten.

[Redacted]

Aan:

[Redacted] 108

[Redacted]

Datum
29 maart 2011

Contact

[Redacted]

Geachte,

Bij deze stuur ik U een toelichting op mijn gewijzigd DEC-voorstel [Redacted]
Heeft metformine een verlagende werking op de zuurstofverzadiging in het bloed naast zijn remmende werking op complex I van de mitochondriële respiratie in de diabete skeletspier?"

De eerste drie punten zijn aangepast in het bijgevoegde voorstel en bij punt 10a heb ik de toelichting laten staan bij de tabel om mijn motivatie te verduidelijken. De laatste vraag betreft of het mogelijk is om metformine aan het drinkwater toevoegen en dat is praktisch natuurlijk wel mogelijk. Alleen hebben we hier niet voor gekozen omdat we bij de voorgaande studie de hoeveelheid drinkwater niet hebben geregistreerd. Maar wat wel opviel is dat de diabete ZDF ratten beduidend meer water drinken dan de gezonde ZDF ratten. Bovendien leek voornamelijk bij de diabete dieren dat het waterverbruik verschillend was tussen de kooien. Aangezien we in deze studie het effect van de dosering willen bestuderen is het erg belangrijk dat deze heel nauwkeurig is. In een andere studie merkten we dat onnauwkeurige dosering een grotere spreiding dan verwacht in de resultaten opleverden. Bovendien zou het toedienen via drinkwater betekenen dat ik de ratten geïsoleerd zou moeten huisvesten om de exacte dosering te weten wat mijns inziens veel meer stress oplevert dan het oraal doseren. Bij deze hoop ik uw vragen voldoende beantwoord te hebben.

Hoogachtend,

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Aan:

voorzitter

Uw referentie:

Onze referentie

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“Heeft metformine een verlagende werking op de zuurstofverzadiging in het bloed naast zijn remmende werking op complex I van de mitochondriële respiratie in de diabete skeletspier”*, is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Bij punt 3 verzoekt de DEC de eerste zin aan te passen in “mens en/of gezonde” mensgebonden onderzoek.
- De DEC merkt op dat de berekening van de aantallen bij punt 7c niet juist is (groepsgrootte) en verzoekt deze opnieuw te doen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (het bijkomen uit anesthesie en de bloedafname ook vermelden).
- De DEC vraagt zich af of de toediening van metformine niet via het drinkwater kan?

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer [redacted] gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

[redacted]

[redacted]
Voorzitter DEC

[REDACTED]

Aan: [REDACTED]

P [REDACTED]
S [REDACTED]

Ons kenmerk [REDACTED]

Doorkiesnummer [REDACTED]

Project: *Heeft metformine een verlagende werking op de zuurstofverzadiging in het bloed naast zijn remmende werking op complex I van de mitochondriële respiratie in de diabete skeletspier.*

Verantwoordelijk onderzoeker (VO): [REDACTED]

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

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een **positief advies**.

Projectnummer: [REDACTED]

Diersoort: rat

Aantal dieren: 82

Einddatum: 29-04-2015

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

[REDACTED]

[REDACTED]