

Herziene versie

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
10-06-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			Vetmetabolisme
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	----------------

Financieel beheerder

Budgetnummer	503220
--------------	--------

Titel van het onderzoek:

Gevolgen van acute inspanning op het vetmetabolisme in de insuline resistente lever en skeletspier van de rat

startdatum 01/06/11 einddatum⁹ 01/05/15 Duur van de proef¹⁰: 2 weken

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

Diergroep	1	2	3	4	5	6	
ctrl/exp/sham	exp	exp	exp	exp	ctrl	ctrl	
Diersoort	02	02	02	02	02	02	
Stam	ZDF-fa/+	ZDF-fa/fa	ZDF-fa/+	ZDF-fa/fa	ZDF-fa/+	ZDF-fa/fa	
Construct / mutatie ?	Nee	Nee	Nee	Nee	Nee	Nee	
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02	02	
Aantal	12	12	12	12	12	12	
Geslacht	man	man	man	man	man	man	
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	
Leeftijd/gewicht	12 wk	12 wk	12 wk	12 wk	12 wk	12 wk	
Doel van de proef *	33	33	33	33	33	33	
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01	
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01	01	
Mate ongerief *	04	04	04	04	04	04	
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	

* VHI-coderingen zie bijlage

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

Titel: Gevolgen van acute inspanning op het vetmetabolisme in de insuline resistente lever en skeletspier van de rat

1. Doel van de proef.

Deze vervolgstudie op 'Bepaling postprandiaal vetmetabolisme in skeletspier en lever van gezonde en type 2 diabetes ratten' (DEC 2009 – 117) past in het onderzoek naar vetmetabolisme in type 2 diabetes (T2D). Insuline resistentie wordt gezien als de eerste stap in de ontwikkeling in het ziektebeeld van T2D. In vorig onderzoek is een abnormale stapeling van vet geobserveerd in insuline resistente organen als de lever en de spieren. Het is bekend dat inspanning een positief effect heeft op de insuline gevoeligheid en vetstapeling in spieren. Om een goed beeld van de invloed van directe inspanning op het vetmetabolisme in zowel de spier als de lever te krijgen, is het noodzakelijk om direct *in vivo* te meten. Met behulp van de nieuwe toepassing van de niet-invasieve ^1H - ^{13}C magnetische resonantie spectroscopie (MRS) methode en de orale toediening van het niet-toxisch en niet-radioactief ^{13}C -gelabeld vet als substraat uit eerder vermeld onderzoek kan een kinetisch profiel opgesteld worden van de netto vetopname en -depletie in lever- en spierweefsel. Dit zal vervolgens een beter inzicht verschaffen over afwijkingen in vetopname en -depletie van nieuw oraal ingenomen vetten in de insuline resistente lever en skeletspier van de rat na een acute inspanning. Het doel van dit onderzoek is om de dynamiek van het vetmetabolisme in de lever en skeletspier na acute inspanning in gezonde en type 2 diabetes ratten te bepalen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Anno 2010 hadden ruim 810.000 Nederlanders diabetes en dit aantal neemt jaarlijks toe met 71.000. Hiervan hebben ongeveer 700.000 mensen T2D maar dit aantal ligt waarschijnlijk hoger aangezien diabetes type 2 niet altijd wordt opgemerkt. Een vroeg kenmerk van T2D is insuline resistentie. Hierbij reageert het lichaam minder goed op insuline en/of wordt er niet genoeg insuline aangemaakt om een normale glucose huishouding te behouden. T2D ontstaat meestal op oudere leeftijd maar de laatste tijd worden steeds meer mensen jonger dan 30 jaar gediagnosticeerd. Dit kan het gevolg zijn van het toenemend aantal mensen met overgewicht en een slecht voedingspatroon. Minimaal 5 miljoen Nederlanders hebben overgewicht ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) en/of zijn lichamelijk inactief, waardoor zij een verhoogd risico op T2D hebben. Met het voorgestelde diermodel kan de invloed van insuline resistentie op de dynamiek van het vetmetabolisme in de lever en skeletspier kort na een acute inspanning bepaald worden. Dit verschaft een beter inzicht in de invloed van acute inspanning op vetopname en -depletie van nieuw oraal ingenomen vetten in de insuline-resistente lever en skeletspier en in de pathogenese van T2D. Ook zal het goede informatie bieden voor toekomstige (in)activiteitsinterventies.

3. Alternatieven

In het kader van de 3 V's draagt het niet-invasieve karakter van ^1H -MRS bij aan de verfijning van het onderzoek. De huidige *in vitro* technieken zijn niet toereikend om het complexe vetmetabolisme na te bootsen. Daarom is het belangrijk om dit *in vivo* te bepalen. In een proefdierenstudie kunnen veel omstandigheden gecontroleerd worden, waardoor de oorzaakgevolg relatie uitstekend bestudeerd kan worden. Gezien het feit dat de invloed van inspanning onderzocht wordt, dient de inspanning in elk dier zoveel mogelijk hetzelfde te zijn. Het lopen in een tredmolen met shockstelsel is erg goed controleerbaar. Dit is helaas niet het geval bij een tredmolen zonder shockstelsel. Zwemmen zou ook een alternatief kunnen zijn. Hierbij speelt het drijfvermogen, dat waarschijnlijk verschillend is tussen ratten met een verschillend vetpercentage, een grote rol. Om dezelfde inspanning te verkrijgen dient men het abdomen te verzwaren, wat eveneens extra stress met zich mee kan brengen.

4. Ethische afweging

Ondanks dat ^1H - ^{13}C MRS een niet-invasieve methode is, zal toch dit experiment aanzienlijk ongerief opleveren. Het niet-toxische ^{13}C -gelabelde vetzuur wordt oraal en zonder anesthesie toegediend. Deze methode bleek in voorgaande onderzoeken 2008 -024 en 2009 – 117 nauwelijks ongerief te veroorzaken. In totaal zal het dier 1 maal een inspanning van één uur leveren, wat een milde mate van ongerief tot gevolg zal hebben, en drie ^1H -MRS metingen van ca. 3 uur ondergaan. De dieren zullen na de laatste meting opgeofferd worden, terwijl ze nog steeds onder anesthesie zijn. Omdat verwacht wordt dat dit onderzoek

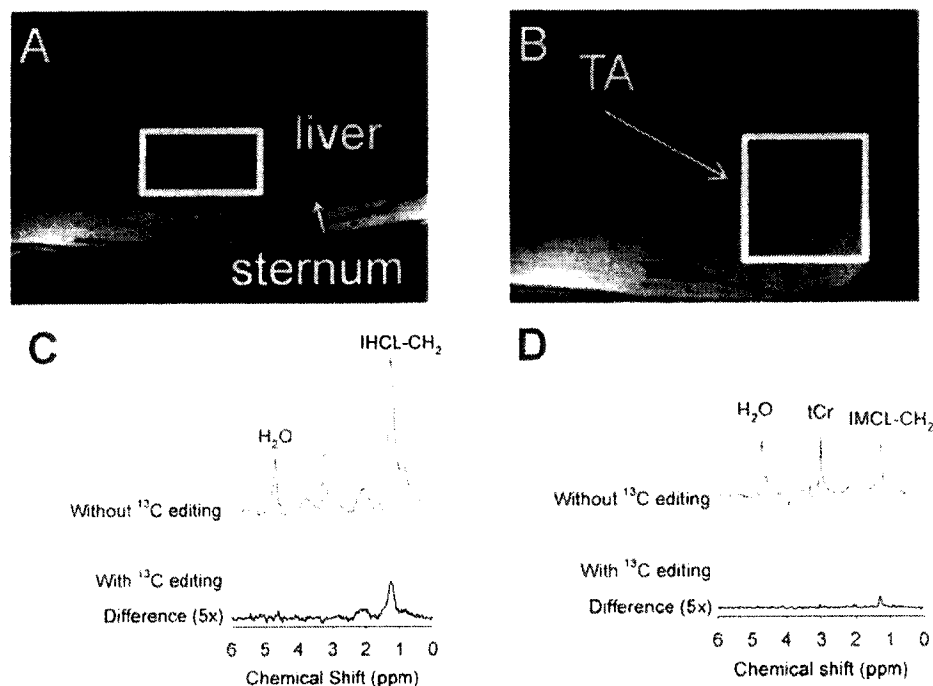
bijdraagt aan het vinden van de oorzaak of mogelijk behandeling van type 2 diabetes, vindt de VO de experimenten verantwoord.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Obesitas, insuline resistentie (IR) en daaruit volgend type 2 diabetes (T2D) zijn een groeiend probleem in onze westerse maatschappij. T2D is een zeer complex ziektebeeld waarbij meerdere organen betrokken zijn. T2D wordt gekarakteriseerd door IR in de perifere weefsels. In de IR toestand is de respons van weefsels op insuline zwakker dan normaal, resulterend in een lagere glucose opname in skeletspier en een hogere endogene glucose productie in de lever. De β -cellen in de pancreas gaan vervolgens extra insuline aanmaken ter compensatie. T2D zal ontstaan wanneer de aanmaak van insuline vermindert als gevolg van het falen van de β -cellen. De exacte moleculaire processen die ten grondslag liggen aan IR blijven echter onopgelost en er zijn nog steeds geen goede indicatoren voor een vroege detectie van IR.

Uit onderzoek is gebleken dat een abnormale lipide homeostase ten grondslag ligt aan T2D. T2D patiënten hebben verhoogde waarden voor vrije vetzuren en triglycerides in het bloed als gevolg van gedaalde insuline gevoeligheid van vetweefsel. Overmatige ectopische vet depositie in verschillende weefsels zoals de lever (IHCL) [1] en de skeletspier (IMCL) [2] behoort tot de kenmerken van T2D en obesitas. IR heeft een correlatie met zowel IMCL [3] als IHCL concentraties [4]. Het is algemeen bekend dat fysieke activiteit leidt tot een verbetering van de insuline gevoeligheid in gezonde mensen en diermodellen [5, 6]. Verder is bekend dat een enkele inspanning een accumulatie van vetten in de lever [7-9] en een daling in de skeletspier [8, 9] tot gevolg heeft. De centrale vraag is of de dynamiek van het vetmetabolisme van nieuw ingenomen vetten in zowel de IR lever als de IR skeletspier na een enkele inspanning van 1 uur veranderd is ten opzichte van de gezonde lever en skeletspier.

Met behulp van ^{13}C -verrijkt vet en de nieuwe toepassing van een ^1H - ^{13}C MRS methode (LASER-POCE) uit in het verleden uitgevoerd onderzoek (DEC 2008 – 024 & 2009 - 117) zal in het voorgestelde onderzoek de dynamica van de netto IMCL/IHCL opslag en verbruik worden bepaald na een inspanning van 1 uur. Met behulp van deze LASER-POCE methode kan verschil gemaakt worden tussen vetten met en zonder ^{13}C -gelabelde vetzuurketens. Na toediening van ^{13}C -verrijkte vetten zal de ^{13}C -verrijking in de IMCL/IHCL pool bepaald worden op 4 uur en 24 uur na de toediening. De stijging van ^{13}C -verrijkte vetten op 4 uur na toediening geven een maat voor vetopslag in de IHCL/IMCL pool en de concentratie ^{13}C -verrijkte vetten in de IMCL/IHCL pool op 24 uur na de toediening geeft een maat voor de depletie van de nieuw opgenomen vetten.

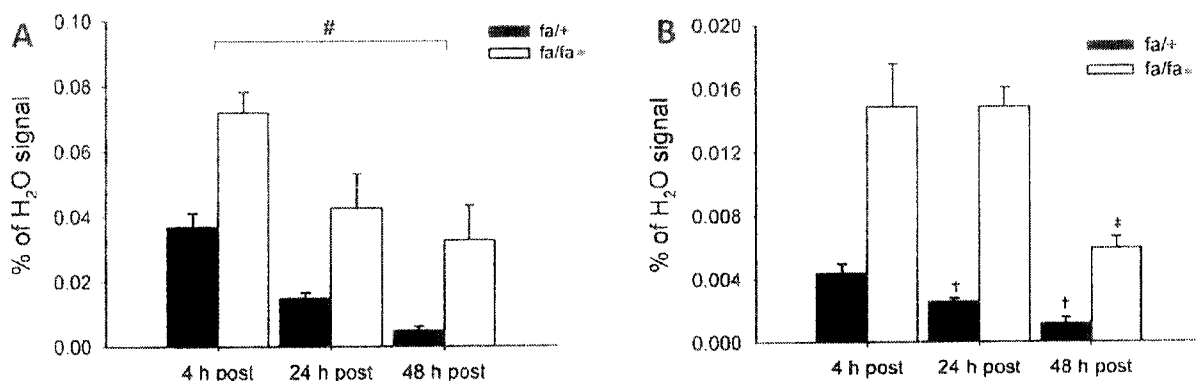


Figuur 1: Voorbeeld van gelokaliseerde water-onderdrukte ^1H -MR spectra (lever: C, spier: D) gemeten in een $4 \times 2 \times 4 \text{ mm}^3$ voxel in de lever (A) en een $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ voxel in de spier (B). H_2O : residueel water; tCr : totaal creatine; IHCL: intrahepatocellulaire lipides. IMCL: intramyocellulaire lipides.

In figuur 1 is een typisch resultaat van de LASER-POCE methode te zien. De plaatjes A en B tonen een

dwarsdoorsnede van de abdomen en van het onderste gedeelte van de achterpoot van een rat, met een voxel (wit) in de lever en *tibialis anterior* spier. De plaatjes C en D laten 3 spectra van de voxels zien. Het bovenste spectrum is een typische weergave van een spectrum waarbij de editing puls niet toegepast is en waarin alle signalen positief aan het spectrum bijdragen. Het middelste spectrum is een weergave van een spectrum waarbij de POCE puls toegepast is en waarin de signalen van protonen gebonden aan ^{12}C positief en protonen gebonden aan ^{13}C kernen negatief bijdragen aan het spectrum. Ten slotte, toont het 'difference spectrum' het verschil spectrum tussen eerder genoemde spectra, waarin enkel de protonen gebonden aan ^{13}C kernen bijdragen. Door de integraal van de IHCL/IMCL- CH_2 piek te bepalen, kan de ^{13}C verrijking in de lipide pool bepaald worden.

De genetisch belaste ZDF *fa/fa* rat wordt als tegenhanger van de humane variant van type 2 diabetes gezien, waarbij genetische aanleg aanwezig is. De ZDF *fa/+* blijft normoglycemisch en zal geen IR of T2D ontwikkelen en dient als controle. In vorig onderzoek is de LASER-POCE methode uitgevoerd op dezelfde soort ZDF ratten op 4 uur en 24 uur na toediening van de ^{13}C -gelabelde vetzuren, maar zonder een inspanningsinterventie (DEC 2009 – 117). Uit de resultaten bleek dat de vetopname verhoogd is in de dieren met T2D ten opzichte van de controle dieren (figuur 2).



Figuur 2: Concentratie ^{13}C -gelabelde vetten in (A) lever en (B) *tibialis anterior* spier op 4 uur, 24 uur en 48 uur na orale toediening ^{13}C -gelabeld vet in gezonde (*fa/+*) en type 2 diabetes (*fa/fa*) ratten. De data staan uitgedrukt als gemiddelde $\pm$ SEM.

De inspanning zal op een gemotoriseerde tredmolen gebeuren. Dit model is in het verleden gebruikt door verschillende onderzoekers, onder andere bij muizen [10], maar ook bij ratten [11, 12]. Met de tredmolen is het mogelijk om ratten te laten lopen met een bepaalde snelheid en eventueel onder een bepaalde hellingshoek. De ratten worden gestimuleerd om te lopen door middel van een raster dat elektrische schokjes kan toedienen. In de tredmolen kunnen maximaal 3 ratten tegelijk lopen. Het apparaat is van

Na het succesvol opzetten van de LASER-POCE methode in DEC 2008 - 024, en de toepassing op een T2D diemodel in DEC 2009 - 117, wordt deze methode nu toegepast op een T2D diemodel na een inspanningsinterventie van 1 uur.

6. Wetenschappelijke beoordeling

De onderzoekslin wordt gefinancierd uit het

project is door de principal investigator op zijn wetenschappelijke en maatschappelijke merites beoordeeld en goedgekeurd.

Dierproef

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In deze studie zal gebruik gemaakt worden van de ZDF rat, geleverd door Charles River. De homozygote recessieve mannetjes (fa/fa) zullen met een Purina 5008 dieet op een gecontroleerde manier type 2 diabetes ontwikkelen. De heterozygote (fa/+) magere genotypes blijven normoglycemisch en zullen als controle groep dienen. De eindbestemming van de rat is opoffering.

7b. Sexe

Er wordt in dit onderzoek gekozen enkel voor ratten van het mannelijke geslacht. De snelheid waarmee type 2 diabetes zich ontwikkelt bij ZDF/Gmi-fa/fa ratten is afhankelijk van het geslacht en daarom is het verstandig om de twee geslachten gescheiden te houden. In deze studie wordt voor mannetjes gekozen, omdat deze sneller en beter voorspelbaar type 2 diabetes ontwikkelen.

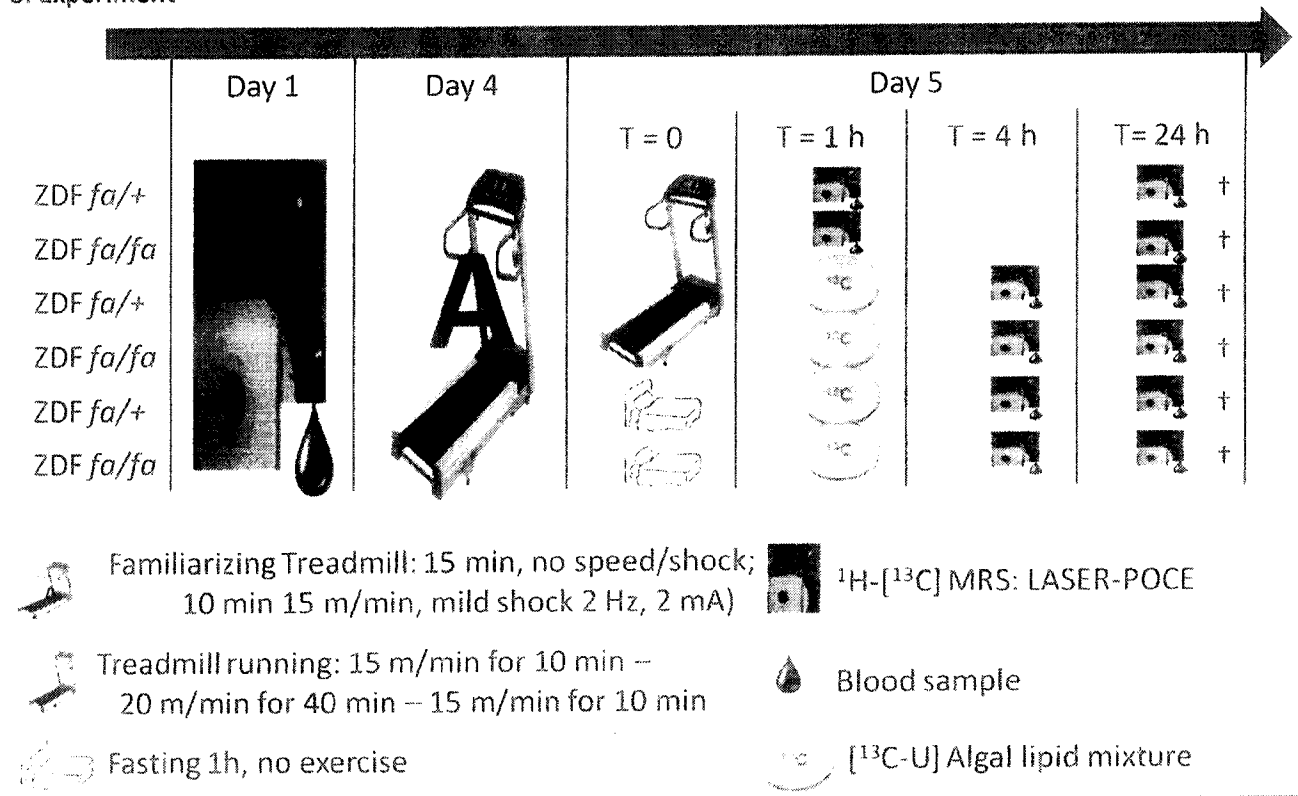
7c. Aantallen

Als uitgangspunt voor de power berekening wordt de ^1H MRS meting gebruikt. In een vorige rattenstudie bleek dat de spreiding van ^{13}C -verrijking ongeveer 0.5% is. Het beoogde effect van inspanning op ^{13}C -gelabelde lipiden concentratie wordt geschat op 0.7%. Voor een tweezijdige toets met $\alpha=0.05$ en $\pi=90\%$ geldt: $n = 21.02 * (0.5/0.7)^2 = 10.72$

De uitval in het vorige soortgelijke onderzoek was uiterst gering. Er is 1 dier gestorven in 2 groepen van 6 dieren. Dit komt neer op 8.3%. Steekproefgrootte = $10.72/0.92 = 11.70$ dus 12 dieren per groep. Met 6 groepen komt het totaal tot 72 dieren.

Groep	Genotype	Inspanning	^{13}C gelabeld substraat	Aantal
1	ZDF fa/+	Ja	Nee	12
2	ZDF fa/fa	Ja	Nee	12
3	ZDF fa/+	Ja	Ja	12
4	ZDF fa/fa	Ja	Ja	12
5	ZDF fa/+	Nee	Ja	12
6	ZDF fa/fa	Nee	Ja	12
Totaal				72

8. Experiment



Na aankomst krijgen de ratten *ad libitum* toegang tot water en het speciale PURINA 5008 dieet. Na een week van gewenning zullen de ratten een LASER-POCE meting (SOP 1) ondergaan om de basale totale (^{12}C + ^{13}C) en ^{13}C -gelabelde lipide concentraties en in de lever en *tibialis anterior* spier te bepalen. Na minimaal 2 dagen herstel worden alle ratten op dag 1 geacclimatiseerd met de tredmolen. De rat wordt 15 min in een laan op de tredmolen geplaatst zonder dat de band loopt en de shocker staat ook uit. Vervolgens wordt de band aangezet op 15 m/min. De shocker wordt aangezet op 2 Hz repetitie met 2 mA intensiteit. De shocker moet de motivatie leveren om de rat te laten lopen. De maximale instellingen van de shocker zijn 4 Hz van 3.4 mA. Aangezien een beloning in de vorm van een traktatie/snoepje de vethuishouding zal beïnvloeden en dat iedere rat deze beloning niet noodzakelijk in zijn geheel tot zich zal nemen, is, mede gezien het feit dat de rat maximaal twee maal kort met het shocksysteem te maken kan krijgen, er voor gekozen om niet met een beloningssysteem te werken. Na 10 minuten lopen gaat de rat terug naar de kooi. De volgende dag zal de rat een inspanning van 1 uur doen. Het dier begint met 10 min lopen op 15 m/min, vervolgens 40 min op 30 m/min, en als laatste 10 min lopen op 15 m/min.

De tredmolen is uitgerust met een shock detectie systeem (SDS) en software, waarmee het aantal shocks dat een rat krijgt binnen een bepaald tijdsinterval geregistreerd wordt. Wanneer de rat 10 shocks in 10 seconden krijgt, wordt de rat als uitgeput gezien. De inspanningstest wordt beëindigd na 1 uur of wanneer de rat uitgeput is. De ratten uit de groep 1 – 4 zullen deze inspanningstest uitvoeren.

Direct na de inspanning worden de ratten uit groep 1 en 2 onder anesthesie gebracht en in de scanner geplaatst voor de LASER-POCE meting. Na afloop wordt de rat terug in zijn kooi geplaatst. Op 24 uur na de inspanningstest ondergaat de rat opnieuw een LASER-POCE meting. De ratten uit groep 3 en 4 krijgen direct na de inspanning ^{13}C -gelabelde vetten oraal toegediend. Vervolgens ondergaan ze 4 uur en 24 uur later het LASER-POCE experiment. De ratten uit groep 5 en 6 zullen in plaats van de inspanningstest gedurende 1 uur vasten en krijgen vervolgens ^{13}C -gelabelde vetten oraal toegediend. Na 4 uur en 24 uur ondergaan ze het LASER-POCE experiment. Na afloop van de laatste meting, terwijl het dier onder anesthesie is, worden de ratten geëuthanaseerd door middel van verbloeden (SOP 2), zodat weefsel uitgesneden kan worden voor histo- en biochemische analyses.

Aan het einde van elk LASER-POCE experiment worden bloedmonsters afgenomen via de *vena saphena* (SOP 3) van elke rat in elke groep.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Met ademhalingsanesthesie worden de ratten verdoofd: ze worden in een inductiekamer van plexiglas geplaatst die aangesloten wordt op de aanvoerleiding voor anesthesie. Dragergas: medische lucht (0,6 l/min) en eventueel O_2 anesthesie: iso-fluraan (Forene [®]), voor de inductie 2-3% en daarna 1-2,5% als onderhoud. Het onderhoud van de anesthesie gebeurt met een mondkapje.

9b. Pijnbestrijding

Wanneer de dieren 10 shocks in 10 seconden krijgen, wordt de inspanningsproef beëindigd. Er zal geen pijnbestrijding toegepast worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie vindt plaats door verbloeden onder anesthesie (SOP 2).

Humaan eindpunt: wanneer er 15% of meer gewichtsverlies optreedt of het dier niet meer eet of drinkt, zal het geëuthanaseerd worden.

Zorg

10a. Ongerief

Aard	Freq.	Duur	Score
^1H - ^{13}C MRS (LASER-POCE) experiment	3 keer	3 uur	02
Ontwaken uit anesthesie	2 keer	10 min	03
Orale toediening ^{13}C -verrijkte vetten	0/1 keer	5 min	02
Lopen op tredmolen	2 keer	60 min	04

De MRS meting is niet erg belastend voor de dieren. Het ongerief als gevolg van de MRS meting wordt geschat op gering/matig (02). Het ongerief van maximaal 2 maal ontwaken uit anesthesie wordt geschat op 03. Het ongerief als gevolg van het oraal toedienen van ^{13}C -gelabelde vetten wordt geschat op 02 en het ongerief als gevolg van inspanning op een tredmolen wordt geschat op 04.

10b. Welzijnsevaluatie

In DEC 2008 – 024 en 2009 – 117 is gebleken dat de dieren geen schade aan hun welzijn ondervinden als gevolg van de orale toediening van het substraat, evenals de 3 uur durende scan. De gebruikte anesthesiemethode zorgt zelfs na lange metingen voor het snel ontwaken van de dieren (binnen 10 minuten). Wanneer de dieren gestimuleerd worden om te lopen en als gevolg 10 shocks in 10 seconden krijgen, wordt de inspanningsproef beëindigd.

11. Verzorging en huisvesting

De ratten worden gehuisvest in de proefdiervoorziening van de TU Eindhoven. Alle beschreven experimenten worden in het ... uitgevoerd. De dieren zullen met 2 in een kooi zitten met kooiverrijking en krijgen voedsel en water ad libitum. Extra aandacht is vereist voor wat betreft het voer: de ZDF ratten moeten met een dieet voer gevoerd worden (Purina 5008). Bij calamiteiten zal de artikel 12 en eventueel artikel 14 gewaarschuwd worden.

12. Deskundigheid

De proef zal uitgevoerd worden door de VO, in het bezit van zijn WOD art. 9. Hulp en assistentie wordt verzorgd door ervaren biotechnici, in het bezit van WOD art 12. De MRS metingen zijn gedeeltelijk gelijk aan eerder uitgevoerde studies (DEC 2009-117 en 2008-024). Deze metingen zijn door dezelfde onderzoeker en medewerkers CPV uitgevoerd en zijn probleemloos verlopen.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage.

Relevante literatuur

1. Ryssy, L., et al., *Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients*. Diabetes, 2000. 49(5): p. 749-58.
2. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. 51(1): p. 7-18.
3. Krssak, M., et al., *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ^1H NMR spectroscopy study*. Diabetologia, 1999. 42(1): p. 113-6.
4. Marchesini, G., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. 107(5): p. 450-5.
5. Ivy, J.L., T.W. Zderic, and D.L. Fogt, *Prevention and treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Exerc Sport Sci Rev, 1999. 27: p. 1-35.
6. Goodyear, L.J. and B.B. Kahn, *Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity*. Annu Rev Med, 1998. 49: p. 235-61.
7. Gorski, J., et al., *Effect of prolonged exercise on the level of triglycerides in the rat liver*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1988. 57(5): p. 554-7.
8. Hu, C., et al., *Lipidomics analysis reveals efficient storage of hepatic triacylglycerides enriched in unsaturated fatty acids after one bout of exercise in mice*. PLoS One, 2010. 5(10): p. e13318.
9. Strackowski, M., et al., *The effect of a single bout of exhaustive exercise on muscle carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus*. Acta Diabetol, 2000. 37(1): p. 47-53.
10. Spiekerkoetter, U., et al., *Changes in blood carnitine and acylcarnitine profiles of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice subjected to stress*. Eur J Clin Invest, 2004. 34(3): p. 191-6.
11. Smith, A.C., et al., *Metformin and exercise reduce muscle FAT/CD36 and lipid accumulation and blunt the progression of high-fat diet-induced hyperglycemia*. Am J Physiol Endocrinol Metab,

2007. **293**(1): p. E172-81.

12. Pold, R., et al., *Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats.* *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 928-34.

Bijlage

SOP 1: ^1H - ^{13}C MRS meting *in vivo* in rat skeletspier en lever

- * Rat wordt gewogen
- * De rat wordt in de inductiekamer geplaatst dat verbonden wordt met de anesthesie-aanvoerleiding. Het dragergas is medische lucht (0,6 l/min) en O_2 anesthesie: isofluraan (2-3% voor de inductie en nadien 1-2,5% voor onderhoud tijdens de meting)
- * Er worden verschillende sensoren aangebracht voor de monitoring: het ballonnetje voor de ademhaling wordt onder de thorax geplaatst, de rectale thermometer wordt ingebracht en een thermometer wordt tussen het dier en het warmhoudmatje gelegd.
- * De ogen van de rat worden bevochtigd met oogzalf
- * Spiermeting: de poot wordt zo op de spoel gepositioneerd dat het middelste, dikste gedeelte van de te meten spierbuik in het midden van de ^1H RF-spoel ligt. De poot wordt ook zo gepositioneerd dat de vermoedelijke vezelrichting van de spier evenwijdig loopt met het hoofdmagneetveld van de scanner (// aan de langste as van de boring). De positie van de poot wordt gefixeerd met behulp van stukjes zacht schuim.
- * Levermeting: het dier wordt zo op de spoel gepositioneerd dat de lever midden boven de ^1H RF-spoel ligt.
- * Een tweede warmhoud-matje wordt op het dier gelegd.
- * De opstelling wordt in de scanner geplaatst.
- * De dosering van de anesthesie tijdens de meting wordt gebaseerd op de ademhalingsnelheid: de duur tussen 2 ademhalingscycli wordt tussen 800 en 1200 ms gehouden.
- * Op het einde van de meting wordt de rat ofwel geëuthanaseerd (SOP 2) ofwel bijgebracht in de recovery met behulp van O_2 bij 30°C , afhankelijk van het protocol.

SOP 2: Opoffering onder anesthesie door middel van verbloeden

- * Rat onder IsoFlo-narcose (kapje)
- * Testen oog- teenreflex
- * Buik en Thorax ruim scheren
- * Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie voor pijnbestrijding
- * Buik en Thorax ruim scheren
- * Minimale huidincisie
- * Huid zijdelings vrij prepareren
- * Buik openen zodat diafragma zichtbaar is
- * Met spits schaartje klein gaatje in diafragma maken onder xyphoïd
- * Ingewanden opzij leggen en *vena cava caudalis* aanprikken
- * Bloed aspireren met een spuit

SOP 3: BLOEDAFNAME VIA VENA SAPHENA

Doel:

Het herhaaldelijk afnemen van kleine hoeveelheden bloed onder anesthesie via de *vena saphena*.

Benodigdheden:

- * rat – naald (blauw): 0.5 mm x 25 mm, 23 G)
- * Fixatiedoek (om het dier in the fixeren, bijv. washandje of handdoek)
- * Gaasjes of tissues
- * Warmtebron: infrarode lamp (150 Watt) of Warmtebox (Beta Corp)
- * Scheerapparaat
- * EDTA-cupjes

Vorbereiding:

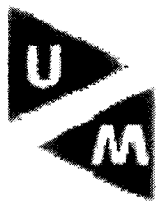
- * Het dier komt uit de opstelling van het MRS experiment (SOP 1) en wordt op een warmtemat geplaatst onder een mondkapje waardoor de anesthesie wordt toegediend.
- * Het dier indien nodig verwarmen m.b.v. een waterlamp of –box, om de vena saphena goed zichtbaar te maken. Gedurende het opwarmen bij het dier blijven.
 - o Warmtelamp: minimale afstand tot het dier 50 cm
 - o Duur: minimaal 5 tot maximaal 15 minuten.
- * Warmtebox:
- * Temperatuur instellen op ongeveer 37°C
- * Duur: minimaal 5 tot maximaal 15 minuten.
- * De linker of rechter achterpoot wordt geschoren ter hoogte van de hak aan de laterale zijde.
- * De rechter of linker achterpoot wordt gefixeerd tussen duim en wijsvinger zodat de poot gestrekt wordt.
- * De poot wordt gestuwd door meer of minder druk op de binnenzijde van het bovenbeen (liesgebied) uit te oefenen.

Bloedafname:

- * Zodra de vene goed zichtbaar is, wordt deze aangeprikt in het midden van het vat loodrecht op de huid.
- * Door meer of minder te stuwen kan de uitstromende hoeveelheid beïnvloedt worden.
- * Het bloed wordt opgevangen in een cupje.
- * Per dier wordt een nieuwe naald gebruikt.

Nazorg:

- * Tijdens en na afloop van de bloedafname wordt gecontroleerd of het dier ongewenste effecten van de handeling ondervindt. Na de bloedafname wordt gedurende enkele seconden de aanprikplek met een gaasje dichtgedrukt. Om het bloeden te verminderen kan ook de voet geflexed worden.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan: TUE/i

Postbus 513
5600 MB Eindhoven

..., voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043

Uw referentie:

Onze referentie : 1

Maastricht, 31-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Gevolgen van acute inspanning op het vetmetabolisme in de insuline resistente lever en skeletspier van de rat*", is op de DEC vergadering van 27 mei 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Bij punt 4 verzoekt de DEC de tekst "geeft de meting weinig ongerief", aan te passen in "zal toch dit experiment aanzienlijk ongerief opleveren".
- Bij punt 6 verzoekt de DEC toe te voegen dat dit DEC protocol wetenschappelijk beoordeeld en **goedgekeurd** is door, enzovoort.
- Bij punt 7c wenst de DEC de motivering waarom er met een power van 90 is gerekend.

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

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-071, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Postbus 513, 5600 MB Eindhoven

voorzitter

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon 090 000 0000

Postbus 513, 5600 MB Eindhoven

Intern adres:

Onderwerp

Aanpassing 2011 - 071

Datum

31 mei 2011

Contact

Uw kenmerk

Geachte

Naar aanleiding van de vragen/opmerking die de DEC had aangaande project 2011 – 071, kan ik daarop de volgende antwoorden geven:

1. Bij punt 4 verzoekt de DEC de tekst "geeft de meting weinig ongerief", aan te passen in "zal toch dit experiment aanzienlijk ongerief opleveren".
2. Bij punt 6 verzoekt de DEC toe te voegen dat dit DEC protocol wetenschappelijk beoordeeld en **goedgekeurd** is door, enzovoort.
3. Bij punt 7c wenst de DEC de motivering waarom er met een power van 90 is gerekend.

Punten 1 en 2 zijn aangepast en grijs gemarkeerd in de aanvraag. Er is gekozen voor een power van 90%, omdat we type II errors zo veel mogelijk willen vermijden. Anders missen we misschien ten onrechte het effect van een enkele inspanning op de vet opname en afbraak in de lever en skeletspier, want de te verwachten verschillen zijn klein ten opzichte van de natuurlijke variatie in de resultaten.

Met vriendelijke groet,

Aan: TUE/1

Postbus 513
5600 MB Eindhoven

<i>Ons kenmerk</i>	<i>Doorkiesnummer</i>	<i>Maastricht</i>
	043-	15-06-2011

Project: *Gevolgen van acute inspanning op het vetmetabolisme in de insuline resistente lever en skeletspier van de rat.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
T (043) 3

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**.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-071
Diersoort: rat
Aantal dieren: 72
Einddatum: 10-06-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

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

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM