

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011- 015

Ontvangen: 03-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
07-02-2011	Nieuw

VROM/GGONR ¹

LVN/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.			Levermetabolisme
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	------------------

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	503220-10008903
--------------	-----------------

Titel van het onderzoek:

Gelokaliseerde ¹H- [¹³C] MRS detectie van ¹³C-gelabelde lipiden in de rattenleverstartdatum 01/02/11 einddatum 01/02/15 Duur van de proef¹⁰: 14 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					
Diersoort	02	02					
Stam	Wistar	Wistar					
Construct / mutatie ?	nec	nec					
Herkomst (leverancier) *	02	02					
Aantal	7	4					
Geslacht	man	man					
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja					
Leeftijd/gewicht	14 weken	14 weken					
Doel van de proef *	33	33					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	04	04					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VIII-coderingen zie bijlage

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Gelokaliseerde ^1H - ^{13}C MRS detectie van ^{13}C -gelabelde lipiden in de rattenlever

1. Doel van de proef.

Deze studie situeert zich in het onderzoek van levermetabolisme in type 2 diabetes. In dit onderzoek zal een nieuwe methode onderzocht worden om vetzuuropname in de lever gelokaliseerd *in vivo* te bepalen. Dit gebeurt met behulp van gelokaliseerde ^1H - ^{13}C MRS na infusie van gelabelde vetzuren die noch toxisch noch radioactief zijn. De lever speelt een belangrijke rol in het vetmetabolisme waarbij vrije vetzuren binnenkomen en geproduceerd worden, en lipiden en lipoproteïnen opgeslagen en geëxporteerd worden. Insuline resistentie, dat een kenmerk is van type 2 diabetes, geeft een verandering in de balans tussen deze influx of synthese van levervetten en hun export of oxidatie dat leidt tot het ophopen van vet in de levercellen. Dit noemt men steatose, leververvetting of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Deze verhoogde opstapeling van vetten in de lever kan verscheidene oorzaken hebben: een verhoogde influx van vrije vetzuren, een verhoogde *de novo* lipogenese, een veranderende export van lipoproteïnen, een verlaagde oxidatie van de vrije vetzuren, of een combinatie van deze oorzaken. Met behulp van de voorgestelde methode is het mogelijk om een vetzuur vanaf het moment van opname te volgen in de tijd. Hierdoor kan bepaald worden wat de snelheid van opname en afbraak/export van vetzuren in de lever is. Met behulp van ^1H - ^{13}C MRS kan ook de totale triglyceride concentratie in de lever bepaald worden. Bovendien zal ook een bloedkinetiek studie uitgevoerd worden om de invloed te bepalen van een constante infusie van vetzuren op de vetzuur concentraties in het bloed.

Het doel van dit onderzoek is om met behulp van ^{13}C -gelabelde vetzuren en gelokaliseerde ^1H - ^{13}C MRS de kinetiek van het vetmetabolisme te bepalen in de lever van Wistar ratten.

Er wordt in dit onderzoek enkel gebruik gemaakt van gezonde dieren om te testen of de hier gebruikte methode werkt. In toekomstige studies zal de hier opgezette methode dan worden toegepast in rattenmodellen van type 2 diabetes en insuline resistentie met leversteatose. Verder zal er in de toekomst onderzoek gedaan worden naar het effect van vetzuursamenstelling, zoals de ketenlengte en de mate van verzadiging.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Anno 2010 hebben ruim 810.000 Nederlanders diabetes en dit aantal neemt jaarlijks toe met 71.000. Hiervan hebben ongeveer 700.000 mensen (80-95%) type 2 diabetes maar dit aantal ligt waarschijnlijk hoger aangezien diabetes type 2 niet altijd wordt opgemerkt. Een vroeg kenmerk van type 2 diabetes is insulineresistentie. Hierbij reageert het lichaam minder goed op insuline en/of wordt er niet genoeg insuline aangemaakt om een normale glucose huishouding te behouden.

Type 2 diabetes ontstaat meestal op oudere leeftijd maar de laatste tijd worden steeds meer mensen jonger dan 30 gediagnosticeerd. Dit kan het gevolg zijn van het toenemend aantal mensen met overgewicht en een slecht voedingspatroon. NAFLD komt meer voor bij mensen met diabetes (50%) en obesitas (76%). Ongeveer 50% van de Nederlandse bevolking heeft overgewicht (BMI > 25) en ongeveer 12% heeft obesitas (BMI > 30). Van hen heeft ongeveer 60 tot 75% NAFLD of leversteatose. Dit is een omkeerbaar proces, dus de vetopstapeling verdwijnt zodra de oorzaak wordt weggenomen. Wanneer de oorzaak niet wordt weggenomen, breidt de vetstapeling zich uit en kan een ontsteking van de lever ontstaan: Niet Alcoholische Lever Hepatitis (NASH). NASH kan uiteindelijk ontaarden in levercirrose.

3. Alternatieven

In dit onderzoek wordt de methode om de opname en afbraak van de gelabelde vetzuren in de lever te meten geoptimaliseerd en wordt de reproduceerbaarheid van de methode getest. Wanneer de methode op punt staat, kan vermeden worden dat in de toekomst onnodig te veel dieren gebruikt worden.

De bestaande *in vitro* technieken zijn niet in staat om het vetmetabolisme in de lever te imiteren waardoor het nodig is om dit *in vivo* te bepalen. De ^1H - ^{13}C MRS methode kan ook bij mensen worden toegepast. Het is echter niet mogelijk om insuline resistentie of type 2 diabetes te induceren in mensen en deze vervolgens te volgen in de tijd.

4. Ethische afweging

Doordat ^1H - ^{13}C MRS een niet-invasieve methode is, geeft de meting weinig ongerief. Het niet-toxische ^{13}C -gelabelde vetzuur wordt toegediend onder anesthesie waardoor ook dit amper ongerief zal veroorzaken. Er wordt 1 lange meting uitgevoerd die elk dier maximaal 3 maal ondergaat met 6 weken tussen opeenvolgende metingen. Voor en na de metingen zal er ook telkens een kleine hoeveelheid bloed afgenomen worden. De dieren zullen na de laatste meting opgeofferd worden wanneer ze nog steeds onder anesthesie zijn.

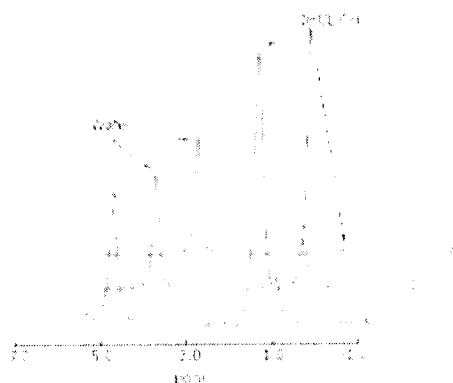
Voor de bloedkinetiekstudie zal het dier vetzuren toegediend krijgen waarna op regelmatige tijdstippen bloedsamples afgenomen zullen worden. Elk dier zal maximaal 3 maal onderworpen worden aan de studie met telkens 6 weken tussen opeenvolgende studies. Er wordt verwacht dat dit onderzoek zal bijdragen aan het vinden van de oorzaak van leversteatose bij type 2 diabetes. Daarom vindt de onderzoeker de experimenten verantwoord.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Een veranderende levensstijl en voedingspatroon zorgen ervoor dat meer en meer mensen lijden aan zwaarlijvigheid. Dit kan leiden tot type 2 diabetes, dat gekarakteriseerd wordt door insulineresistentie en leversteatose. Insulineresistentie betekent dat spieren, vet en lever niet goed reageren op insuline. Hierdoor wordt glucose niet opgenomen door de lichaamscellen om gebruikt te worden voor energie. Wanneer glucose niet wordt opgenomen door de cellen zullen hoge glucoseconcentraties ontstaan in het bloed, wat hyperglycemie genoemd wordt. Deze hoge plasma glucoseconcentraties geven aan de β -cellen in de pancreas een signaal om meer en meer insuline te produceren (hyperinsulinemie) maar het is niet genoeg om te blijven voldoen aan de vraag. Type 2 diabetes ontstaat dan wanneer de β -cellen niet langer in staat zijn om voldoende insuline te produceren. De exacte moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor het veroorzaken van insulineresistentie zijn nog niet volledig duidelijk.

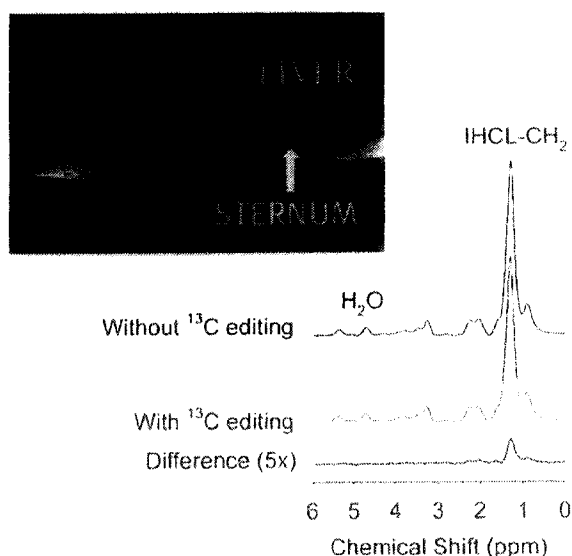
Insulineresistentie van de lever wordt vooral gekenmerkt door vetopstapeling in de hepatocyten. Eén van de belangrijkste oorzaken hiervan is een verhoogde afbraak van triglyceriden in vetweefsel naar vrije vetzuren, wat dan op zijn beurt een verhoogde influx geeft van deze vrije vetzuren naar de lever. Deze verhoging van de flux samen met hyperinsulinemie geeft een toename van *de novo* lipogenese waarbij het teveel aan glucose wordt omgezet naar triglyceriden [1]. Ook een aantal transcriptiefactoren (ChREBP-1c, SREBP-1, PPAR γ), die beïnvloed worden door glucose en insuline, kunnen aanleiding geven tot een verhoogde *de novo* lipogenese [1-7]. In de lever zelf zal het grootste deel van de vrije vetzuren omgezet worden naar triglyceriden in plaats van geoxideerd worden tot acetyl-CoA [5, 8-9]. Ook is er een verminderde glycogeenopslag in de lever waardoor meer glucose via *de novo* lipogenese wordt omgezet naar triglyceriden [3]. De geproduceerde triglyceriden kunnen dan de lever verlaten als very-low-density-lipoproteïnen (VLDL) of worden opgeslagen in de hepatocyten [10]. Door de grote hoeveelheid aan triglyceriden, zal er een grotere stapeling zijn in de lever. De VLDL productie zal eveneens veranderen door een veranderende samenstelling van de VLDL deeltjes of een veranderende productiesnelheid van zijn componenten [11-13]. De hoeveelheid triglyceriden opgeslagen in de lever, de intrahepatocellulaire lipiden (IHCL), is sterk gerelateerd met insulineresistentie [14]. Ook wordt IHCL gebruikt om te kijken in welke mate er leversteatose is omdat het histologisch spectrum van NAFLD kan variëren van goedaardig, tot gemiddelde steatose, tot steatose met hepatocellulaire ontsteking en beschadiging (NASH) [11] (figuur 1). In 1 op de 20 gevallen zal NASH evolueren naar cirrose en is er een verhoogd risico op het ontwikkelen van leverkanker (hepatocellulair carcinoom).



Figuur 1: Typische proton MR spectrum van de lever in personen met verschillende graden van vetinfiltratie. Spectrum a toont minimale vetinfiltratie, spectrum b toont een lever met gemiddelde vetinfiltratie en spectrum c een spectrum met erge vetinfiltratie [15].

De vraag die we in toekomstig onderzoek willen beantwoorden is of een verhoogde IHCL accumulatie in rattenmodellen van type 2 diabetes en insulineresistentie het gevolg is van een verhoogde influx van vetzuren, een toename van *de novo* lipogenese, een verminderde oxidatie van de vetzuren of een veranderende export. Het doel van deze studie is om een methode op te zetten die het mogelijk maakt om de dynamiek te onderzoeken van het inbouwen van endogene vetzuren in, en vrijkomen van opgeslagen vetzuren uit IHCL met een hoge tijdsresolutie.

In het voorgestelde onderzoek zal de dynamiek van de IHCL opslag en verbruik over de tijd gevolgd worden tijdens de infusie van ^{13}C gelabelde vetzuren in het bloed. Met behulp van ^1H - ^{13}C MRS worden vervolgens de signalen van protonen gebonden aan ^{13}C specifiek waargenomen door gebruik te maken van verschilspectroscopie (POCE editing) [16-17]. Deze methode werd al met succes uitgevoerd in lever en spier met een lage tijdsresolutie (4, 24 en 48 uur na toediening) na het oraal toedienen van ^{13}C gelabeld vet (figuur 2). Het nadeel van de orale toediening is dat niet precies bekend is hoeveel ^{13}C gelabeld vet uiteindelijk in de bloedbaan terecht komt. Daarom willen we in dit onderzoek ^{13}C gelabelde vetzuren direct in de bloedbaan inbrengen. Verder willen we de tijdsresolutie van de meting verhogen om de dynamiek van het vetmetabolisme beter te kunnen beschrijven. Daartoe zullen opeenvolgende metingen worden uitgevoerd terwijl de rat in de scanner onder anesthesie blijft. We hebben al in eerdere experimenten in ons lab al ervaring met de methode, waarbij gebruik gemaakt wordt van een infusie van ^{13}C gelabelde vetzuren, in de spier. Deze aanpak bleek echter niet mogelijk door een te lage incorporatie van het label, maar is nog niet getest in de lever. Wij verwachten dat deze methode wel resultaat zal geven in de lever omdat het rustmetabolisme hoger is in de lever dan in de spier.



Figuur 2: ^1H MR spectrum zonder en met ^{13}C editing van de lever. Het bovenste spectrum is bekomen met een ^1H spin echo zonder ^{13}C inversie, de middelste is met ^{13}C inversie en het onderste is het POCE spectrum en is het verschil van beide.

De belangrijkste doelen van deze studie zijn om de methode te optimaliseren en de reproduceerbaarheid te testen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit specifieke onderzoek is gelezen en akkoord bevonden door de promotor en co-promotor van de VO en VVO, beide werkzaam in de an de TU/e.

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Er wordt gekozen voor Wistar ratten, geleverd door Charles River. Er wordt geopteerd voor ratten omdat het huidige en toekomstige onderzoek gebeurt in insuline resistente en type 2 diabetes ratmodellen. De eindbestemming van de rat is opoffering.

7b. Sexe

In dit onderzoek zal gebruik gemaakt worden van mannelijke Wistar ratten. In deze studie wordt voor mannetjes gekozen, omdat met het oog op toekomstig onderzoek, deze sneller en beter voorspelbaar type 2 diabetes ontwikkelen wanneer ze op een hoog vet dieet gezet worden.

7c. Aantallen

Groep 1: 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 0.3% is. Het beoogde effect wordt geschat op 0.5%. Voor een tweezijdige toets met $\alpha=0.05$ en $\pi=80\%$ geldt: $n = 15.7 * (0.3/0.5)^2 = 5.65$

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 = $5.65/0.92 = 6.14$ dus 7 dieren in groep 1.

Groep 2: Voor de bloedkinetiekstudie zullen 4 dieren gebruikt worden die de studie maximaal 3 maal ondergaan. Aangezien deze studie nog niet eerder in ons lab uitgevoerd is, kiezen we voor een minimum aantal dieren van 3 met een mogelijke uitval van 1, wat tot een totaal van 4 dieren komt.

7 Dierproef

8. Experiment

Experiment 1:

Alle ratten van de eerste groep ondergaan dezelfde behandelingen en metingen (SOP 1):

9:30	PRE meting	1 MRS meting
10:00	infusie C13	
10:00	start POST meting	
	einde POST	
15:00	meting	

Voor de metingen wordt een veneus katheter aangebracht in de staartvene om de ^{13}C gelabelde vetzuren toe te dienen tijdens de MRS metingen.

Zowel totaal IHCL als ^{13}C -gelabelde IHCL worden gemeten in de lever. Deze meting vindt plaats juist voor de infusie van het $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ palmitaat (PRE meting). Er zal een 10 mM oplossing van $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -kaliumpalmitaat toegediend worden. Dit gelabeld kaliumpalmitaat is gebonden aan albumine voor transport in het lichaam. Eerst wordt een bolus toegediend van 0,5 ml en vervolgens een continue infusie van 1,5 ml/uur. De uitgewerkte berekening hiervan is te vinden in bijlage.

Na deze infusie start de eigenlijke real-time meting (POST meting). De dieren worden onder anesthesie gehouden en gemonitord gedurende alle metingen. Dezelfde dieren zullen meerdere malen gemeten worden, met een maximum van 3 maal en een periode van 6 weken tussen opeenvolgende metingen. Na de laatste meting wordt de rat onder anesthesie gehouden en wordt dan aansluitend opgeofferd om de gemeten MRS data te valideren. De lever wordt dan verwijderd en ingevroren in vloeibare stikstof. Met behulp van GS-IRMS (gas chromatography isotope ratio mass spectrometry) zal de incorporatie van het gelabelde ^{13}C atoom in de IHCL pool bepaald worden. Voor en na de MRS meting zal een bloedsample afgenomen worden uit de vena saphena (SOP 2).

Experiment 2:

De bloedkinetiek studie wordt uitgevoerd op een tweede groep dieren, die de MRS metingen niet ondergaan. Er wordt eveneens een veneus katheter aangebracht in de staartvene (SOP 3) waarlangs de vetzuren (niet gelabeld) zullen toegediend worden. Eerst wordt een bolus toegediend van 0,5 ml vetzuren waarna de rat continu geïnfuseerd wordt (1,5 ml/uur). De bloedsamples (100 μl) zullen om de 30 minuten afgenomen worden via de vena saphena (SOP 2). De studie zal ongeveer 5 uur duren en elke rat zal de meting maximaal 3 maal ondergaan met een periode van 6 weken tussen opeenvolgende metingen. Op het einde van de meting wordt de rat ofwel geëuthanaseerd ofwel bijgebracht, afhankelijk van het protocol.

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 $^{\circ}$), voor de inductie 3-4% en daarna 1-2,5% als onderhoud. Het onderhoud van de anesthesie gebeurt met een mondkapje.

9b. Pijnbestrijding

Er zal geen pijnbestrijding toegepast worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie vindt plaats door verbloeden onder anesthesie (SOP 4).

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

10a. Ongerief



Experiment 1:

De MRS meting is niet erg belastend voor de dieren. Het ongerief als gevolg van de MRS meting wordt geschat op gering/matig (02). De gebruikte anesthesiemethode zorgt zelfs na lange metingen voor het snel ontwaken van de dieren (binnen 5 minuten). Het ongerief van maximaal 2 maal ontwaken uit anesthesie wordt geschat op 04. Het inbrengen van een infuuslijn in de staartvene geeft een ongerief van 02.

Experiment 2:

Het inbrengen van de infuuslijn in de staartvene en de bloedafname via de vena saphena geven een ongerief van 02. Het ongerief van maximaal 3 maal ontwaken uit anesthesie is 04.

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. Bij calamiteiten zal de artikel 12 en eventueel 14 gewaarschuwd worden.

12. Deskundigheid

De proef zal uitgevoerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker, in het bezit van zijn WOD art. 9. Hulp en assistentie krijgt hij van ervaren biotechnici, in het bezit van WOD art 12. De MRS metingen zijn gedeeltelijk gelijk aan eerder uitgevoerde studies (OE nr 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 bijgevoegde documenten

Relevante literatuur

1. Szendroedi, J. and M. Roden, *Ectopic lipids and organ function*. Curr Opin Lipidol, 2009. 20(1): p. 50-6.
2. Trauner, M., M. Arrese, and M. Wagner, *Fatty liver and lipotoxicity*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1801(3): p. 299-310.
3. Capeau, J., *Insulin resistance and steatosis in humans*. Diabetes Metab, 2008. 34(6 Pt 2): p. 649-57.
4. Gallagher, E.J., D. Leroith, and E. Karnieli, *Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome*. Mt Sinai J Med, 2010. 77(5): p. 511-23.
5. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J Clin Invest, 2004. 114(2): p. 147-52.
6. Postic, C. and J. Girard, *The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis*. Diabetes Metab, 2008. 34(6 Pt 2): p. 643-8.
7. Postic, C. and J. Girard, *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. J Clin Invest, 2008. 118(3): p. 829-38.
8. Mendez-Sanchez, N., et al., *Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. Liver Int, 2007. 27(4): p. 423-33.
9. Lewis, G.F., et al., *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2002. 23(2): p. 201-29.
10. Cano, A., et al., *Hepatic VLDL assembly is disturbed in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease: is there a role for dietary coenzyme Q*. J Appl Physiol, 2009. 107: p. 707-717.
11. Adams, L.A., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Nonalcoholic fatty liver disease*. CMAJ, 2005. 172(7): p. 899-905.

12. Adiels, M., et al., *Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance*. *Diabetologia*, 2007. **50**(11): p. 2356-65.
13. Baldeweg, S.E., et al., *Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. *Eur J Clin Invest*, 2000. **30**(1): p. 45-52.
14. Anderwald, C., et al., *Effects of insulin treatment in type 2 diabetic patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle*. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 3025-32.
15. Cox, I.J., et al., *Current and future applications of in vitro magnetic resonance spectroscopy in hepatobiliary disease*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(30): p. 4773-83.
16. Henry, P.G., et al., *Proton-observed carbon-edited NMR spectroscopy in strongly coupled second-order spin systems*. *Magn Reson Med*, 2006. **55**(2): p. 250-7.
17. Henry, P.G., et al., *Semiselective POCE NMR spectroscopy*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2000. **44**(3): p. 395-400.

Bijlage: ^{13}C gelabeld vetzuur infusaat

Het infusaat bestaat uit een 10 mM oplossing van $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -palmitaat.

Er wordt eerst een Krebs-Ringer buffer gemaakt van pH 7.4. In 20ml van deze buffer wordt 2,2g essential FFA-free BSA (1,67mM)(MM 66000g/mol) opgelost.

Dan wordt $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -kaliumpalmitaat (MM 310.39g/mol) toegevoegd om een 10mM oplossing te geven = 62.078mg.

SOP 1: In vivo $^1\text{H-}[^{13}\text{C}]$ MRS met real-time ^{13}C -tracer meting in ratten 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 eventueel O_2 anesthesie: isofluraan (3-4% voor de inductie en nadien 1-2,5% voor onderhoud tijdens de meting)
- * De staartvene wordt aangeprikt zoals vermeld in SOP 3 en het dier wordt in de meetopstelling gelegd. Het bovenlichaam wordt op de verwarmde houder geplaatst en de anesthesie en lucht worden nu toegediend via een mondkapje. Het volledige lichaam van de rat wordt verwarmd.
- * Er worden verschillende sensoren aangebracht voor de monitoring: het ballonnetje voor de ademhaling wordt op of 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
- * De rat wordt zo gepositioneerd dat de lever bovenaan ligt, zo dicht mogelijk en in het midden van de spoel.
- * Deze positie wordt gefixeerd met zacht schuim
- * De volledige opstelling wordt in de scanner geplaatst
- * De anesthesie wordt tijdens de metingen bijgestuurd naargelang de ademhalingsnelheid
- * De PRE meting wordt gestart
- * Na een initiële bolus van 0,5 ml ^{13}C gelabelde vetzuren wordt de rat continu geïnfuseerd met ^{13}C gelabelde vetzuren (1,5 ml/uur).
- * De real-time $^1\text{H-}[^{13}\text{C}]$ MRS meting start (POST meting). Elke 20 minuten wordt een nieuwe meting uitgevoerd
- * Op het einde van de meting wordt de rat ofwel geëuthanaseerd ofwel bijgebracht in recovery bij 30°C , afhankelijk van het protocol.

SOP 2: BLOEDAFNAME VIA VENA SAPHENA

Doel:

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

Benodigdheden:

- * muis – naald (oranje): 0.5 mm x 16 mm, 25G x 5/8"
- 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
- * Cupjes (al dan niet gehepariniseerd)

Voorbereiding:

- * 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.
- * Het dier wordt gefixeerd door het tot het bekken in een speciaal daarvoor gemaakte dubbelgestikte washand (CPV) te laten lopen (of kies een andere manier van restraining).
- * Het dier wordt vervolgens met de volle hand over de rug stevig rond het bekken vast gepakt.
- * 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.

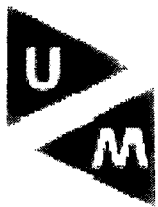
SOP 3: Inbrengen van infuuslijntje in staartvene voor toedienen van vloeistoffen

- * Sedatie met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie: 2.5%; onderhoud: 1-2%). Het anestheticum wordt toegediend via een mondkapje met behulp van medische lucht als dragergas. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex.
- * Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de rat gepositioneerd wordt, onder voortdurende bewaking van de ademhalingsfrequentie.

De staartvene zal worden aangeprikt en een infuusslangetje inclusief spuit wordt aangesloten en gefixeerd.

SOP 4: Opoffering onder anesthesie door middel van verbloeden

- * Rat onder IsoFlo-narcose (kapje)
- * Testen oog- teenreflex
- * Buik en Thorax ruim scheren
- * Huidincisie in abdomen onder borstbeen 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



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 :

Maastricht, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Gelokaliseerde ^1H -/ ^{13}C] MRS detectie van ^{13}C -gelabelde lipiden in de rattenlever*", is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * Bij punt 6 verzoekt de DEC de eerste drie zinnen, tot en met "dit onderzoek", te verwijderen.
- * Bij punt 7c verzoekt de DEC de aantallen te motiveren middels een powerberekening, op basis van eerdere gegevens.
- * Bij punt 10a denkt de DEC dat de dieren slechts 2x wakker worden uit anesthesie. Zo ja, dan verzoekt de DEC de tekst aan te passen.

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 2011-015, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Postbus 513, 5600 MB Eindhoven

NL a2.60, Postbus 513, 5600 MB Eindhoven
Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Onderwerp
Wijziging 2011 - 015

Datum
3 februari 2011

Contact

Uw kenmerk

Geachte DEC-UM,

Naar aanleiding van de vragen/opmerking die de DEC had aangaande project 2011 – 015, kan ik daarop de volgende antwoorden geven:

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Bij punt 6 verzoekt de DEC de eerste drie zinnen, tot en met "dit onderzoek", te verwijderen. **Deze zijn verwijderd.**
- Bij punt 7c verzoekt de DEC de aantallen te motiveren middels een powerberekening, op basis van eerdere gegevens. **De powerberekening voor groep 1 is toegevoegd. Voor groep 2 kiezen we voor een minimaal aantal dieren van 3 + 1 extra dier wanneer uitval plaats vindt, wat niet te verwachten is.**
- Bij punt 10a denkt de DEC dat de dieren slechts 2x wakker worden uit anesthesie. Zo ja, dan verzoekt de DEC de tekst aan te passen. Dit is **correct en is aangepast**

Met vriendelijke groet,

PhD candidate

Aan: TUE/

Postbus 513
5600 MB Eindhoven

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
08-02-2011

Project: Gelokaliseerde ^1H -[^{13}C] MRS detectie van ^{13}C -gelabelde lipiden in de rattenlever.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM
T (043)

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

Bezoekadres

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

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-015

Diersoort: rat

Aantal dieren: 11

Einddatum: 07-02-2015

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

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM