

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-139

Ontvangen: 27-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
07-11-2011	Nieuw		

Hoofdproject	CARIM					
--------------	-------	--	--	--	--	--

Deelproject	3.					
-------------	----	--	--	--	--	--

Financieel beheerder	Budgetnummer	30983271B
----------------------	--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Effect van glycolalx beschadiging op insuline-gemedieerde glucose opname in skeletspieren in ratten

 startdatum **NOV2011** einddatum ⁹ **NOV2015** Duur van de proef¹⁰: 6 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	

Diergroep	A	B	C	D	E		
ctrl/exp/sham	Ctrl	Exp	Exp	Exp	Exp		
Diersoort	02	02	02	02	02		
Stam	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar		
Construct / mutatie ?	-	-	-	-	-		
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02		
Aantal	12	12	12	12	12		
Geslacht	m/v	m/v	m/v	m/v	m/v		
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja		
Leeftijd/gewicht	300-350 gram	300-350 gram	300-350 gram	300-350 gram	300-350 gram		
Doel van de proef *	31	31	31	31	31		
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	04	04	04		
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01		

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

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

Titel: Effect van glycocalyx beschadiging op insuline-gemedieerde glucose opname in skeletspieren in ratten

1. Doel van de proef.

Het doel van deze studie is te onderzoeken wat het effect van een beschadigde glycocalyx en specifieke therapie hiervan is op de insuline-gemedieerde glucose opname in de spier.

Het betreft een vervolg onderzoek op DEC nr. 2009-015 (**Effect van glycocalyx beschadiging op insuline gevoeligheid in ratten**). Tijdens dit onderzoek is aangetoond dat na afbraak van de glycocalyx met het enzym hyaluronidase de glucose opname uit het bloed onder invloed van insuline vermindert, wat suggereert dat perifere insuline gevoeligheid verlaagd is. In deze studie willen we aantonen dat de verminderde insuline gevoeligheid een gevolg is van een verminderde en/of vertraagde opname van glucose in de skeletspier.

Onze hypothese is dat een kapotte glycocalyx de insuline-gemedieerde glucose opname in de spier vermindert en dat dit herstelt kan worden door glycocalyx-specifieke therapie. De hypothese wordt getest door in skeletspieren van ratten met of zonder enzymatische glycocalyx beschadiging de hoeveelheid gefosforyleerde Akt (P-Akt), Glut4 transporters en fluorescent glucose te meten tijdens een insuline tolerantie test. Wanneer insuline vanuit het bloed naar het interstitium gaat, zal het binden het aan de insuline receptor op spiercellen waardoor deze gefosforyleerd wordt en de "insulinecascade" in werking wordt gezet wordt, in deze cascade speelt Akt een belangrijke rol. Akt wordt namelijk dan ook gefosforyleerd en hierdoor zullen GLUT4 transporters getransloceerd worden naar het celmembraan en hierdoor kan glucose opgenomen worden. Deze fosforylatie vindt snel plaats (piek binnen 5-10 minuten), en er is nog steeds Akt fosforylatie 30 minuten na insuline toediening [1], daarom zal zowel het snelle effect als het latere effect van insuline in de skeletspier onderzocht worden. Verder zal in insuline-resistente ratten worden onderzocht wat het effect van (glycocalyx) therapieën is op de insuline-gemedieerde glucose opname in skeletspieren. Om dit te testen worden ratten voor 6 weken op hoog vet dieet gezet, dit omdat de ratten dan in een vroeg stadium van diabetes zijn (pre-diabetes), na 4 weken zullen deze ratten sulodexide of metformine toegediend krijgen via het drinkwater. Sulodexide en metformine zijn beide therapieën om de glycocalyx te herstellen en insuline gevoeligheid te verbeteren (zie DEC nr. 2010-101).

Na overnacht vasten (vanaf 22.00) zal in de ratten tijdens anesthesie eerst intraveneus een bolus glucose gegeven worden om hypoglycemie te voorkomen, een half uur na deze glucose infusie zal een bolus insuline en tegelijk ook fluorescent glucose toegediend worden. Daarna zal op verschillende tijdstippen een kuitspier (soleus) verwijderd worden om daarin de hoeveelheid P-Akt, glut4 transporters en fluorescent glucose te bepalen. Dit zal gedaan worden in controle ratten, ratten die 6 weken op een hoog vet dieet zijn gezet met of zonder therapie en in ratten waarin specifiek de glycocalyx beschadigd wordt. Glycocalyx beschadiging zal gedaan worden met behulp van het enzym hyaluronidase.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



De prevalentie van type 2 diabetes in Nederland is de laatste jaren enorm gestegen en de voorspelling is dat dit het komende decennium nog verder zal toenemen. Type 2 diabetes hebben een 2 tot 4x verhoogde kans op hart- en vaatziekten. Ten grondslag aan type 2 diabetes ligt insuline resistentie, een verminderde werking van insuline t.a.v. de weefselopname van glucose. Het voorgestelde onderzoek geeft fundamenteel inzicht in de rol van de glycocalyx met betrekking tot de uiteindelijke glucose opname in de spiercellen

3. Alternatieven

Vervanging: De veronderstelde experimenten kunnen niet uitgevoerd worden op gekweekte endotheelcellen omdat deze geen volwaardige glycocalyx produceren en omdat de glucose opname in spieren niet kan worden meegenomen in dit soort experimenten. Een gerichte beschadiging van de glycocalyx doormiddel van een

enzym infusie mag in mensen niet plaatsvinden.

Vermindering: We kunnen in 1 dier twee kuitspieren uitnemen, waardoor op 2 tijdstippen in 1 dier de hoeveelheid P-Akt, glut4 transporters en fluorescent glucose gemeten kan worden. Omdat effecten op 3 tijdstippen gemeten zullen worden, zal het combineren van twee tijdstippen in 1 dier een reductie van het aantal dieren opleveren van 33%.

Verfijning: Het experiment zal plaatsvinden tijdens anesthesie en analgesie, waardoor de rat zo min mogelijk ongerief heeft.

4. Ethische afweging

Dierexperimenten leveren inzicht in de functionerende fysiologie en dragen daardoor bij aan de voortgang van medische kennis. Hart- en vaatziekten zijn doodsoorzaak nummer 1 in de westerse wereld, en door de verwachte toename van het aantal type 2 diabeten zal het aantal patiënten met hart- en vaatziekten nog verder toenemen de komende jaren. Gezien het hoge percentage sterfgevallen en invaliditeit en gepaard gaande medische kosten als gevolg van hart- en vaatziekten is een verbetering van inzicht in de vasculaire processen die een rol spelen bij het ontstaan van deze ziekten van groot maatschappelijk belang. Gestaafd door onze vorige data denken wij dat het ontstaan van cardiovasculair lijden, zoals in diabetes, gepaard gaat met beschadigingen in de glycocalyx, en de hier aangemelde dierproeven leveren belangrijke informatie op over de rol van de glycocalyx in de werking van insuline en opname van glucose, en tevens of de glycocalyx een goede target voor therapie kan zijn. Vanwege het grote maatschappelijke belang zijn de voorgestelde dierexperimenten met een ongerief dat geschat wordt als matig/ernstig, aanvaardbaar.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De glycocalyx is een gelachtige beschermende laag tussen het endotheel en het circulerend bloed [2]. Omdat de glycocalyx onder controle condities niet toegankelijk is voor het stromende bloed zorgt het in de capillairen voor een reductie in functioneel geperfundeed volume van ~40% [3]. Insuline kan het geperfundeed bloed volume laten toenemen en dit is belangrijk voor de glucose opname [4]. Studies laten zien dat een snelheidsbepalende stap voor glucose metabolisme het transendotheliale transport van insuline is. In diabetes patiënten lijkt dit transport langzamer te gaan, waardoor er een verminderde glucose opname is [5]. In eerdere experimenten (dec 2009-015) hebben we aangetoond dat na enzymatische afbraak van de glycocalyx d.m.v. een bolus hyaluronidase de afname van bloedglucose onder invloed van insuline verminderd is. Onze hypothese is dat insuline door het "openzetten" van de glycocalyx zijn eigen transport kan stimuleren en zo ook de opname van glucose, maar dat in geval van glycocalyx schade dit mechanisme belemmerd is. In het voorgestelde onderzoek willen we nu bekijken of de verminderde insuline gevoeligheid na glycocalyx beschadiging komt door een verminderde/vertraagde opname van glucose door de spiercellen. Verder willen we onderzoeken of in een pre-diabetisch model, verschillende therapieën die gericht zijn op herstel van de glycocalyx de afgenomen insuline-gemedieerde glucose opname in de skeletspier weer kunnen verbeteren.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is beoordeeld en akkoord bevonden door de PI van onze groep,

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Rat, Wistar. In DEC2009-015 hebben we ook gebruik van Wistar ratten, waardoor de resultaten van de insuline gevoeligheid gekoppeld kunnen worden aan de resultaten uit deze studie. Bovendien heeft een rat een voldoende groot bloedvolume om voldoende bloedsamples te kunnen nemen voor bloedglucose en plasma insuline bepalingen. Verder is er ervaring met het aanbrengen van een canule in de vena femoralis in deze ratten (DEC nr 2009-015)

Standaard leverancier voor CPV. Leverancier heeft fok- en afleververgunning.

Het dier wordt na de proef opgeofferd.

7b. Sexe

Er is geen reden te veronderstellen dat de modulatie van het glycocalyx volume door insuline sexe-afhankelijk is. Derhalve kunnen gevraagde experimenten in mannetjes- en vrouwtjesdieren uitgevoerd worden.

7c. Aantallen

Tijdens de experimenten van dec2009-015 vonden we een afname van Kitt, dit is een maat voor de snelheid van glucose klaring, na enzym beschadiging van de glycocalyx van $30\% \pm 20\%$ ($\delta = 0.3$; $\sigma = 0.2$). Dit verschil verwachten wij ook in hoeveelheid P-Akt en GLUT4 transporters. Met een power van 0.8, en een type 1 fout van 0.05 (α), en een uitval van 5%, komen we uit op 8 skeletspieren per groep.

Per tijdstip (3) zijn dus 8 skeletspieren nodig en per dier kunnen we 2 skeletspieren uitnemen, dit betekent dat we 12 Wistar ratten per groep nodig hebben (24 skeletspieren).

Totaal 5 experimentele groepen, dit levert dan een totaal aantal dieren van 60 Wistar ratten.

4 Dierproef

8. Experiment

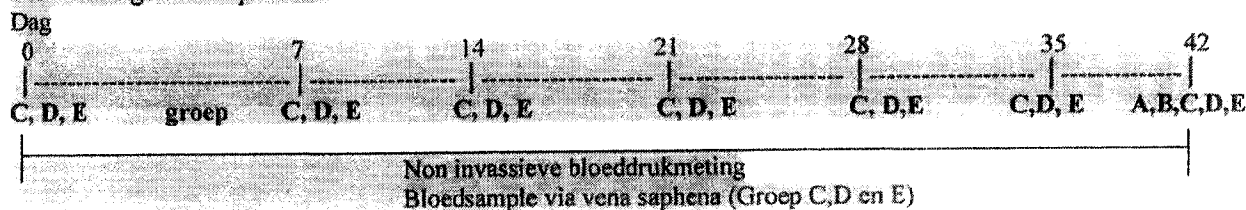
Beschrijving experiment

Zes groepen dieren worden met elkaar vergeleken:

- A) Controle ratten, spier uitgenomen tijdens baseline, 5 en/of 30 minuten na insuline toediening
- B) Ratten met een eenmalige hyaluronidase behandeling, spier uitgenomen tijdens baseline, 5 en/of 30 minuten na insuline toediening
- C) Ratten 6 weken op hoog vet dieet, spier uitgenomen tijdens baseline, 5 en/of 30 minuten na insuline toediening
- D) Ratten 6 weken op hoog vet dieet + 2 weken sulodexide in drinkwater, spier uitgenomen tijdens baseline, 5 en/of 30 minuten na insuline toediening
- E) Ratten 6 weken op hoog vet dieet + 2 weken metformine in drinkwater, spier uitgenomen tijdens baseline, 5 en/of 30 minuten na insuline toediening

De groepen C t/m E zullen 6 weken voor de start van het experiment op een hoog vet dieet worden gezet, hiervan zal groep D twee weken voor de start van het experiment sulodexide toegediend krijgen via het drinkwater en groep E zal metformine via het drinkwater toegediend krijgen. In deze ratten (groep C t/m E) zal gedurende deze 6 weken elke week bloeddruk gemeten worden via de staart (coda system; Kent Scientific) en zal een bloedsample ($\pm 50 \mu\text{L}$) via de vena saphena tijdens wakkere toestand afgenomen worden om bloedglucose en plasma insuline levels te bepalen. Op de dag van het experiment zal bij alle ratten (groep A t/m E) na overnacht vasten (vanaf 22.00u) een canule aangebracht worden in de vena femoralis tijdens isofluraan anesthesie. Hierna zal in groep A, 1 mL saline in groep B, 1 mL hyaluronidase toegediend worden. In alle ratten zal een bolus glucose toegediend worden via de canule in de vena femoralis (bij groep A en B een uur na toediening van saline of hyaluronidase), en een half uur na deze toediening zal een bolus insuline toegediend worden en gelijktijdig ook een bolus fluorescent glucose. Bloed zal afgenomen worden via de staart op $t = -10$ en -3 (pre), 2, 5, 10, 20, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 50 en 60 minuten na glucose toediening voor glucose bepaling met een glucose meter ($0.6 \mu\text{l}$ nodig voor glucose bepaling). Op $t = -3$ (pre), 5, 10, 30, 32, 36, 40, 50 en 60 minuten zal ook $30 \mu\text{L}$ bloed afgenomen worden voor de bepaling van plasma insuline spiegels en fluorescent glucose. De eerste kuitspier zal uitgenomen worden nog voor de glucose infusie (baseline) of 5 minuten na insuline infusie en de tweede kuitspier zal uitgenomen worden 5 of 30 minuten na insuline infusie. Hierna zal de rat opgeofferd worden door middel van verbloeding en het doorknippen van het diafragma.

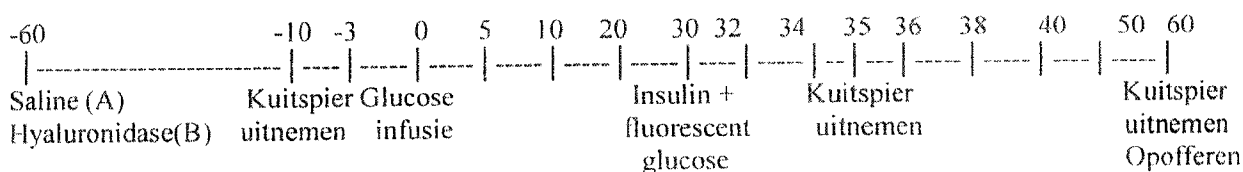
Flowchart gehele experiment:



Start HFD

Therapie (groep D en E) Experiment

Flowchart anesthesie experiment



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Isofluraan anesthesie tijdens het experiment.

9b. Pijnbestrijding

Temgesic® (0.1 mg/kg) wordt subcutaan voor experiment toegediend

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- *De wijze van euthanaseren dient beschreven te worden.*

Na het experiment zal euthanasie toegepast worden d.m.v. verbloeden en het doorknippen van het diafragma.

- *Aangegeven moet worden op welk moment (op basis van welke criteria) men overgaat tot het verantwoord doden van het betrokken proefdier ("humane eindpunten" voor voortijdig doden).*

Tijdens het experiment zal het ongerief bij de dieren bijgehouden worden (gedragskenmerken, ademhaling). Indien bij vaststelling van ernstig ongerief zal tussentijds overgegaan worden op het verantwoord doden van het dier. Verder zal gedurende de periode van arriveren tot het einde van het experiment het ongerief van de dieren bijgehouden worden. Wanneer ernstig tot zeer ernstig ongerief wordt geconstateerd (gelet op ademhaling, houding, activiteit en vacht) of wanneer er een gewichtsafname van >20% optreedt, dan zullen de dieren door VO en/of overige uitvoerende opgeofferd worden.

10a. Ongerief



Groep A, B:

Canulatie van vena femoralis, en de insuline tolerantie test tijdens isofluraan anesthesie (duur 2-2.5 uur): 02

Overnacht vasten voor terminaal experiment (vanaf 22.00h): 03

Totaal ongerief: 03

Groep C, D en E:

Wekelijks een non-invasieve bloeddruk meting: 03

Wekelijks 4-uur 's ochtends vasten: 03

Wekelijks een bloedsample ($\pm 50 \mu\text{L}$) via vena saphena tijdens wakkere toestand: 03

Canulatie van vena femoralis, en de insuline tolerantie test tijdens isofluraan anesthesie (duur 1.5-2 uur): 02

Overnacht vasten voor terminaal experiment (vanaf 22.00h): 03

Totaal ongerief: 04

10b. Welzijnsevaluatie

Voor elke rat zal een welzijnsevaluatie plaatsvinden en dat zal bijgehouden worden voor de ratten van dit dec protocol

11. Verzorging en huisvesting

De ratten worden sociaal gehuisvest en verzorgd in de Centrale Proefdier Voorziening (CPV) van de UM. De metingen worden verricht in het CPV laboratorium voor l

ie. Tijdens de experimenten onder anesthesie van het dier is steeds minimaal één van de vermelde onderzoekers aanwezig om toe te zien op het welzijn van het dier.

12. Deskundigheid

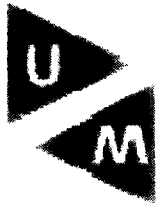
Alle betrokken onderzoekers, zijn bevoegd en bekwaam in hun deskundigheid aangaande de meeste van de voorgestelde experimenten.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De SOP voor canulatie van de vena femoralis is geregistreerd op de website van het CPV (www.cpv.unimaas.nl)

Relevante literatuur

1. Weigert, C., et al., *The phosphorylation of Ser318 of insulin receptor substrate 1 is not per se inhibitory in skeletal muscle cells but is necessary to trigger the attenuation of the insulin-stimulated signal*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37393-9.
2. Nieuwdorp, M., et al., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 480-6.
3. Vink, H. and B.R. Duling, *Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1): p. H285-9.
4. Clerk, L.H., et al., *The vasodilatory actions of insulin on resistance and terminal arterioles and their impact on muscle glucose uptake*. Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(1): p. 3-12.
5. Sjostrand, M., et al., *Delayed transcapillary delivery of insulin to muscle interstitial fluid after oral glucose load in obese subjects*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 152-7.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

De voorzitter
per Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 0

Uw referentie:

Onze referentie:

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effect van glycocalyx beschadiging op insuline- gemedieerde glucose opname in skeletspieren in ratten*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

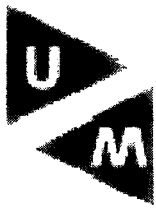
- * Punt 8- De DEC wenst een flowchart voor het gehele experiment per groep en niet alleen voor de opoffering.
- * Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven.

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 2011-139, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



University Maastricht

Aan:

Voorzitter DEC-UM

Geachte

Hierbij de antwoorden op de vragen en opmerkingen met betrekking tot DEC protocol 2011-139.

- De flowchart voor het gehele experiment is toegevoegd bij punt 8.
- De aard, ernst, duur en frequentie is aangepast en per groep gedefinieerd bij punt 10.

Hoogachtend,

Aan

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
08-11-2011

Project: *Effect van glycolatx beschadiging op insuline- gemedieerde
glucose opname in skeletspieren in ratten.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat
voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik
voldoet.

Secretariaat DEC-UM
1

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-139

Dierseort: rat

Aantal dieren: 60

Inddatum: 07-11-2011

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

Vicevoorzitter DEC-UM