

100

1

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie nov. 2005

Herziene versie

DECNR: 2011-033

Ontvangen: 02-03-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
14-03-2011	Nieuw		

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.			
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	--

Financieel beheerder		Budgetnummer	30983284B
----------------------	--	--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Het effect van alfa-liponzuur op diabetes geïnduceerde gestoorde collateraal formatie in ratten.

startdatum 09-3-2011

einddatum⁹ 09-3-2015

Duur van de proef¹⁰: 11 wk

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				
3. Projectleider				
4.			Art.12	
5.				
6.			Art 9	

Diergroep	1	2	3	4	5	6
ctrl/exp/sham	Controle	Controle/diabetes	Diabetes + ALA in voer	Diabetes + ALA in pompje	Controle/diabetes (pilot)	Diabetes + ALA in voer (pilot)
Diersoort	rat	rat	rat	rat	rat	rat
Stam	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar
Construct / mutatie ?	geen	geen	geen	geen	geen	geen
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02	02
Aantal	10	10	10	10	4	4
Geslacht	m	m	m	m	m	m
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Leeftijd/gewicht	8-12wk	8-12wk	8-12wk	8-12wk	8-12wk	8-12wk
Doel van de proef *	31	31	31	31	37	37
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	01	01
Pijnbestrijding *	04	04	04	04	01	01
Mate ongerief *	04	05	05	05	04	04
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

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

Titel: Het effect van alfa-liponzuur op diabetes geïnduceerde gestoorde collateraal formatie in ratten.

1. Doel van de proef.

Perifeer arterieel vaatlijden (PAV) is een uiting van atherosclerose, en leidt tot bloedvatvernauwing in de benen. Mensen met diabetes mellitus hebben een duidelijk verhoogde kans op het ontwikkelen van deze bloedvatvernauwing en het ontwikkelen van ernstig zuurstofgebrek van het been (kritische ischemie). De prognose van perifeer vaatlijden in het kader van diabetes is veel slechter dan bij mensen zonder diabetes, en ischemie is naast infectie de belangrijkste determinant van onderbeenamputaties. Gestoorde collateraalvorming is mogelijk een van de factoren die bijdraagt aan het ernstig klinisch beloop van perifeer vaatlijden bij mensen met diabetes. Een oorzaak voor de gestoorde collateraal vorming bij diabetes is mogelijk de hoge glucose waarden in het bloed, waardoor oxidatieve stress in de cellen toeneemt. Deze oxidatieve stress producten (ROS) kunnen vervolgens leiden tot celdysfunctie en zo betrokken zijn bij de ontwikkeling van vaatcomplicaties.

Uit eerder onderzoek van onze groep is gebleken dat toediening van een anti-oxidant (N-acetylcysteïne) de verstoorde vasculaire relaxatie bij diabetes gedeeltelijk kan voorkomen/verbeteren (DEC 2008-132). Bovendien is gebleken dat het ischemisch achterpoot model (unilaterale ligatie van de a. femoralis), gebruikt kan worden voor de bestudering van collateraalvorming bij ischemie. We hebben aangetoond dat streptozotocine geïnduceerde type I diabetes in ratten de collateraalvorming na femoralis ligatie negatief beïnvloedt (DEC 2009-159).

In experimentele condities is aangetoond dat de anti-oxidant alfa-lipoic acid (ALA) een aantal gunstige effecten heeft op zowel de preventie als de behandeling van diabetes. In Duitsland wordt ALA al jaren gebruikt voor de behandeling van symptomatische neuropathy. Echter het effect van ALA op door diabetes geïnduceerde verminderde collateraal formatie is nog nooit onderzocht.

Het project beoogt dan ook de vraagstelling te beantwoorden of de anti-oxidant ALA het optreden van complicaties zoals een verslechterde collateraal vorming in diabetes mellitus kan reduceren.

Tevens zal het effect van orale versus lokale toedieningsvorm onderzocht worden.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



5% van de volwassenen in de wereld heeft diabetes, en dat aantal zal nog flink toenemen. Diabetes gaat gepaard met vasculaire complicaties aan met name de kleine, maar ook aan de grote vaten. Hoge glucose concentraties zijn de primaire oorzaak voor deze complicaties, maar het mechanisme waarlangs glucose deze complicaties kan induceren is vooralsnog onbekend. Een van deze complicaties is Perifeer arterieel vaatlijden (PAV). PAV is een zeer belangrijk klinisch probleem: 10 tot 30% van de diabetespatiënten lijdt aan PAV. Bovendien is PAV op dit moment de belangrijkste oorzaak van onderbeenamputatie. Gestoorde collateraalvorming is waarschijnlijk een belangrijke determinant van het ernstig klinisch beloop van deze aandoening bij mensen met diabetes. Er is sterke behoefte aan een stof met mogelijk preventieve werking bij het ontstaan van complicaties die snel toepasbaar kan zijn in de patientenzorg. Op dit moment is er echter nog onvoldoende inzicht in de mechanismen van deze gestoorde collateraalvorming en is ook niet goed bekend op welke manier collateraalvorming in dit kader gestimuleerd kan worden.

Een van de mogelijke oorzaken voor de gestoorde collateraal vorming is de toename van oxidatieve stress. Onze hypothese is dat de toediening van een anti-oxidant, in dit geval ALA, een positieve bijdrage levert aan de voorkoming van PAV. Dit zal een eventueel aangrijpingspunt kunnen worden in de toekomstige bestrijding van vasculaire complicaties bij diabetes.

3. Alternatieven

Het ontstaan van vasculaire complicaties en de formatie van collaterale door arteriogenesis en angiogenesis betreft een complex mechanisme met een samenspel van onder andere endotheel, glad spierweefsel en mogelijk andere celtypen (o.a. monocyt/macrofaag). Dergelijke effecten kunnen niet in vitro nagebootst worden. Voor dit type experimenten zijn dus proefdieren nodig.

4. Ethische afweging

De groep mensen die diabetes ontwikkeld wordt steeds groter. De hoge glucose spiegels in hun bloed dragen bij aan het ontstaan van complicaties aan het hart en de vaten. Er is sterke behoefte aan een stof met mogelijk preventieve werking bij het ontstaan van complicaties die snel toepasbaar kan zijn in de patientenzorg. Op de korte termijn zal dit onderzoek ons opheldering geven over het effect van de anti-oxidant ALA op de collateraal vorming bij perifeer vaatleiden in diabetes. De uiteindelijke wetenschappelijke inzichten voortvloeiend uit dit onderzoek (verheldering van het werkmechanisme met implicatie voor therapie) kunnen bruikbaar zijn voor de patiëntenzorg en op grond hiervan achten wij het doen van dit onderzoek en het hiermee gemoeide ongerief voor de dieren gerechtvaardigd.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Arteriogenese (collateraal groei) als reactie op acute occlusie van a. femoralis kan onderverdeeld worden in verschillende fase (overzichtsartikelen: Conway EM 2001; Scholz D 2000). Na occlusie vindt er een redistributie van de bloeddoorstroming plaats, waardoor de shear stress toeneemt in de pre-existente arteriolen. Het endotheel wordt geactiveerd, afgifte van verschillende chemokines en de expressie van adhesie moleculen zorgen voor monocyte aantrekking en migratie in de vaatwand. Na invasie van monocytten start proliferatie van het endotheel en de gladde spiercellen, de extracellulaire matrix wordt afgebroken, zodat de endotheelcel gemakkelijker kan migreren (synthese en migratie dag 3-14 na ligatie) en uiteindelijk vindt er maturatie plaats tot een volwaardige collateraal arterie (21 dagen na ligatie).

Gestoorde collateraalvorming is mogelijk een van de factoren die bijdraagt aan het ernstig klinisch beloop van perifere vaatlijden bij mensen met diabetes. Een oorzaak voor de gestoorde collateraal vorming bij diabetes is mogelijk de hoge glucose waarden in het bloed, waardoor oxidatieve stress in de cellen toeneemt. Deze oxidatieve stress producten (ROS) kunnen vervolgens leiden tot celdysfunctie en zo betrokken zijn bij de ontwikkeling van vaatcomplicaties.

Uit eerder onderzoek van onze groep is gebleken dat toediening van een anti-oxidant (N-acetylcysteine) de verstoorde vasculaire relaxatie bij diabetes gedeeltelijk kan voorkomen/verbeteren (DEC 2008-132). Bovendien is gebleken dat het ischemisch achterpoot model (unilaterale ligatie van de a. femoralis) zoals elders ontwikkeld (Prof. W. Schaper, Max Planck Instituut, Bad Neuheim), gebruikt kan worden voor de bestudering van collateraalvorming bij ischemie. We hebben aangetoond dat streptozocine geïnduceerde type I diabetes in ratten de collateraalvorming na femoralis ligatie negatief beïnvloedt (DEC 2009-159).

In de voorgestelde proef zal het effect van de anti-oxidant alpha-lipoic acid (ALA) op het optreden van complicaties zoals een verslechterde collateraal vorming in diabetes mellitus bestudeerd worden.

In experimentele condities is aangetoond dat ALA een aantal gunstige effecten heeft op zowel de preventie als de behandeling van diabetes (Ghibu S 2009, Lixin L 2010, Cummings B 2010, Yi X 2006). ALA is een middel dat al voor andere doeleinden gebruikt wordt in de kliniek en heeft dus als voordeel dat het snel geïmplementeerd kan worden bij een mogelijk gunstig effect. In Duitsland wordt ALA al jaren gebruikt voor de behandeling van symptomatische neuropathy, een aandoening die vaak voor komt bij mensen met perifere vaatlijden en mogelijk een factor is die betrokken is in de ontwikkeling hiervan. Een verder voordeel van stoffen die oraal toegediend kunnen worden is dat chronisch gebruik mogelijk is. Tevens willen we in het kader van het project (Identification of new endothelial cell related neovascularization inducing

factors) kijken of lokale toediening, dmv een osmotische pomp, een toegevoegde waarde heeft op het voorkomen van complicaties zoals een verslechterde collateraal vorming.

Omdat voor ALA suppletie beschreven is dat het de voedselinname beïnvloedt (mensen en dieren gaan er minder door eten), zouden we graag een pilot uitvoeren. Het effect op voedselinname in combinatie met diabetes is namelijk niet beschreven.

6. Wetenschappelijke beoordeling

De voorgestelde experimenten zijn het vervolg op de projecten '*Het effect van glyoxalase-I overexpressie op diabetes geïnduceerde gestoorde collateraal formatie in ratten*' (DEC 2009-159) en '*Het effect van een verschillende (voedings)interventies op veroudering en vaatfunctie van diabete ratten*' (DEC 2008-132).

Het huidige voorstel is ontwikkeld in samenwerking en tot stand gekomen door intensieve samenspraak met verschillende groepen binnen CARIM en is intern beoordeeld en akkoord bevonden door

en

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Er zal gebruik gemaakt worden van Wistar ratten, verkregen via de standaard leverancier in Nederland (Charles River). Na afloop van het experiment zullen de dieren worden ge-euthanaseerd en gedissecteed en zullen verschillende weefsels en bloed worden opgeslagen voor analyse.

7b. Sexe

In navolging van de eerder uitgevoerde experimenten zal er gebruik worden gemaakt van mannelijke ratten. Er zijn verschillen beschreven tussen geslachten m.b.t. de effecten van oxidatieve stress. Verder beschrijft een studie van Kyriakides et al. (2001) dat oestrogeen angiogenese stimuleert, en door gebruik te maken van mannetjes kunnen we deze confounder uitsluiten.

7c. Aantallen

De ratten worden onderverdeeld in 4 groepen:

- 1) Controle (Niet diabeet)
- 2) Diabeet (STZ-injectie – geen interventie)
- 3) Diabeet (STZ-injectie – interventie met ALA in het voer)
- 4) Diabeet (STZ-injectie – interventie met ALA in een pompje, lokale toediening)

De grootte van de groepen wordt bepaald door de variatie in reperfusie-herstel (mate van collateraalgroei) en de verwachte uitval ten gevolge van het induceren van diabetes. Uit eigen data en de literatuur (Deindl et al., 2004; Hofer et al., 2005; Scholz et al., 2002) weten wij dat de spreiding naar verwachting 12.5% bedraagt en achten wij een minimaal verschil tussen beide groepen van 18% aannemelijk. De groepsgrootte is berekend met het "power and sample size"-programma, met een $\alpha=0,05$, power=0,8, M=1 (ratio n-controle/n-interventie), $\delta=0.18$ en $\sigma=0,125$ voor 'T-test with independent samples'. Hierdoor komt de groepsgrootte op $n=8$. Op grond van ervaring van medewerkers van fysiologie en de literatuur mbt de ligatie en op grond van eigen ervaring mbt het induceren van diabetes wordt de gecombineerde uitval op 20% geschat. Dit betekent dat bij elke groep 2 ratten extra nodig zijn ($a - 0,2a = 8$ of $0.8a = 8$ of $a = 10$). Dit brengt het totaal per groep op 10 ratten.

Het aantal ratten voor het experiment wordt dan 40.

Omdat voor ALA suppletie beschreven is dat het de voedselinname beïnvloedt (mensen en dieren gaan er minder door eten), zouden we graag een pilot uitvoeren. Het effect op voedselinname in combinatie met diabetes is namelijk niet beschreven. Hiervoor zouden we graag 8 diabete dieren inzetten, die na 5 weken diabetes wel of geen ALA in het voer krijgen. (groep 5 en 6)

Pilot 8 ratten extra.

6 Dierproef

8. Experiment

Fase 1: De ratten worden verdeeld over vier groepen.

- 1) Controle (Niet diabetes)
- 2) Diabetes (STZ-injectie – geen interventie)
- 3) Diabetes (STZ-injectie – interventie met ALA in het voer)
- 4) Diabetes (STZ-injectie – interventie met ALA in een pompje, lokale toediening)

De controle groep is nodig omdat er na het beëindigen van de proef de mitochondriële functie, mbv oxygraaf experimenten, bestudeerd zal worden. ALA is een cofactor voor een aantal mitochondriële eiwitten. Door het induceren van diabetes type 1, **maar wellicht ook door de ligatie (zie fase 2)**, zal de mitochondriële functie beïnvloed worden. En om het effect van ALA goed te kunnen inschatten, zal de functie vergeleken moeten worden met normaal waarden in zowel **controle poot als geligeerde poot**. Deze zijn echter binnen de betrokken vakgroepen niet voor handen.

Diabetes zal worden geïnduceerd met een eenmalige injectie (uitgevoerd door medewerkers van het CPV) met streptozotocin (STZ) in de staartvene (50mg STZ per kg lichaamsgewicht; STZ opgelost in 0.02M Natrium-Citraat in fysiologisch zout; max. 0.5ml per rat). De controle dieren worden niet ingespoten. De diabetes toestand zal na 5 dagen worden gecontroleerd m.b.v. een glucose bepaling met een druppel bloed uit de vena saphena (uitgevoerd door een medewerker van het CPV). Alleen de ratten met een bloed glucose > 15mmol/l worden geïncubeerd in de studie. De glucose meting wordt 8 weken na STZ injectie herhaald in nuchtere toestand om het verloop van diabetes in kaart te brengen. Groep 3 zal 9 weken na diabetes inductie ALA gesuppleerd krijgen in het voer tot het einde van het experiment.

Fase 2: Collateralisatie wordt geïnduceerd 10 weken na de injectie met STZ door ligatie van de linker a. Femoralis in **alle groepen**. Bij groep 4 zal tevens een mini osmotische pomp (MRI compatibele 2ML1 pomp van Alzet) geplaatst worden om lokaal ALA te kunnen toedienen. De canule zal boven de ligatie tegen de bloedstroom in in het vat geplaatst worden. De mate van reperfusie mbv Laser Doppler, als indirecte maat van ischemie, wordt voor de operatie, direct na de operatie en op dag 7 na de ligatie onder algehele narcose bepaald.

Fase 3: Op dag 7 na de ligatie zullen de dieren een MRI ondergaan om de mate van collateraal vorming te beoordelen. Na de MRI worden de dieren opgeofferd voor post-mortem analyse van spierweefsel mbt arteriogenese en angiogenese en mitochondriële functie.

Flowchart is toegevoegd aan het einde van bijlage 2

Voor de pilot zal bij de dieren diabetes geïnduceerd worden zoals hierboven beschreven. Na 5 weken zullen de dieren wel of geen ALA suppletie in het voer krijgen. De voedselinname zal worden bijgehouden dmv wegen en een metabole kooi.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor de inductie van achterpootischemie (perifeer) worden de dieren gesedeerd met Temgesic (0,01 mg/kg subcutaan) en onder narcose gebracht mbv 3-4% isofluraan en gehouden mbv 1-2% isofluraan

Voor de MRI worden de dieren geanesthetiseerd met 3-4% isofluraan in een isofluraan box. De anesthesie wordt onderhouden dmv een snuitkapje met 2.0-2.5 % isofluraan.

9b. Pijnbestrijding

Voor post-operatieve pijnbestrijding wordt buprenorfine (Temgesic; 0,1 mg/kg subcutaan; veronderstelde werkduur 12 uur) direct na de operatie toegediend. Dit wordt herhaald in de 24 tot 48 uur na operatie. Een selectieve NSAID kan ivm het onderzoeksplan niet toegediend worden. Bij collateraalvorming speelt de infiltratie van monocytten een belangrijke rol (zoals aangegeven bij punt 5).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Na afloop van het experiment wordt het dier opgeofferd dmv verbloeden onder narcose.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- * Gevallen van automutilatie/necrose, waarbij de rat alle tenen of zelfs de hele voet verwijdert, na ligatie van de a. femoralis. Dit wordt dagelijks gecontroleerd door de onderzoeker

- Gegeneraliseerde afname in zelfverzorging en abnormale verschijning over een lange periode. I.h.b. ruwe haarvacht, uitgebreide alopecia, verlengde diarree, gezwollen extremiteiten, paralyse of andere neurologische verschijnselen (convulsies, abnormale hoofddracht, circulerend gedrag)
- Oncontroleerbare bloedingen
- Een gewichtsafname is van meer dan 20% tgv inductie van diabetes t.o.v. de te verwachte groeicurve in de eerste 6 weken.
- Een gewichtsafname is van meer dan 15% t.o.v. dag 0 tgv van de ligatie.

Zorg

10a. Ongerief



De ongerief score voor dit protocol is ernstig (05).

Te verwachten mate van ongerief voor de dieren in de verschillende fases van het onderzoek:

Vorbereiding proef STZ injecties (1x):	matig / ernstig (04)
Diabeet worden/zijn (11 weken):	matig / ernstig (04)
Druppel bloed glucosebepaling (2x waarvan 1x nuchter):	gering/matig (02)
Metabole kooi (1x 24 uur):	gering/matig (03)
Pre-operatief, toediening pijnbestrijding subcutaan (1x)	gering/matig (02)
Ligatie van a. femoralis onder narcose (1 x 30 min):	matig / ernstig (04) (eerste 3 dgn na ligatie), gering/matig (02) (follow-up dag 4-7 na ligatie)
Laser doppler perfusie onder anesthesie (2 x 20 min):	gering/matig (02)
Anesthesie t.b.v. MRI (1 x 1 uur):	gering/matig (02)
Terminaal experiment:	gering/matig (02)

De dieren zullen het meeste ongerief ondervinden van de tijdelijke ischemie in de achterpoot, waardoor deze minder gebruikt zal worden. In de regel zal bij goed herstel binnen de eerste week het ongerief afnemen. De dieren worden alleen solitair gehuisvest indien mutilatie optreedt om zo onnodig ongerief en verlies van dieren te voorkomen. Hierop zal de eerste dagen post-operatief intensief worden toegezien door de verantwoordelijke onderzoekers op dit project en de medewerkers van het CPV.

De ongeriefscore voor de dieren in de pilot is matig (04)

Vorbereiding proef STZ injecties (1x):	matig / ernstig (04)
Diabeet worden/zijn (6 weken):	matig / ernstig (04)
Druppel bloed glucosebepaling (2x waarvan 1x nuchter):	gering/matig (02)
Metabole kooi (1x 24 uur)	gering/matig (03)

10b. Welzijnsevaluatie

Bij diabetische ratten treden er te verwachten complicaties op op grond van de diabetische toestand: toename van eten, drinken en urineren, geen of geringe gewichtstoename, soms gewichtsafname. Deze kenmerken treden pas op na 3-4 weken.

Uit eerdere studies is gebleken dat er na ligatie een risico aanwezig is voor het ontwikkelen van necrose in de achterpoot. Om dit goed in de gaten te houden zal het dier gedurende de eerste vijf dagen post-operatief dagelijks gecontroleerd worden op zwelling/roodheid/pijn/koud aanvoelen, paarsblauw/zwart verkleuren, necrose en automutilatie. Tevens wordt het eetgedrag geëvalueerd.

11. Verzorging en huisvesting

De ratten zullen in eerste instantie onder normale omstandigheden worden gehuisvest in de ruimtes van het CPV. Tijdens de experimenten en bij het wakker worden van het dier is steeds minimaal één van de vermelde onderzoekers bij de dieren aanwezig, om toe te zien op de toestand van het dier.

12. Deskundigheid

De studie wordt uitgevoerd in samenwerking met de groep van _____ van de afdeling _____ en _____ van de afdeling _____. Iedereen die betrokken is bij deze studie is bevoegd en bekwaam om zijn deel te kunnen uitoefenen. Met de SOPs is er voldoende ervaring uit eerdere experimenten.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De SOPs staan uitgebreid beschreven in de bijlagen:

Bijlage 1

SOP1: Ischemische achterpoot model, ligatie arterie femoralis

SOP2: Ischemische achterpoot model, analyse reperfusie

SOP 3: Ischemische achterpoot model, afname bloedmonsters

SOP 4: MRI onder anesthesie

Bijlage 2

Afwegen en toedienen van STZ

Relevante literatuur

- Conway EM et al. Cardiovasc Res. 2001 Feb 16;49(3):507-21.
- Scholz D et al. Virchows Arch. 2000 Mar;436(3):257-70.
- Kyriakides TR et al. Am J Pathol. 2001 Oct;159(4):1255-62.
- Ghibu S et al. J Cardiovasc Pharmacol. 2009 Nov;54 (5):391-8.
- Lixin L et al. Ann N.Y. Acad Sci. 2010;1203:151-9.
- Cummings B et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010 Feb;R11343-R1350.
- Yi X et al. Diabetes. 2006 aug;55:2238-2244.
- Deindl E, et al., eds. London: Kluwer Academic publishers 2004:115.
- Hoefler IE, et al., J. Am. Col. Of Cardiol. 2005;46:994.
- Scholz D, et al., J Mol Cell Cardiol. 2002;34:775.

Bijlage 1

SOP1: Ischemische achterpoot model, ligatie arterie femoralis

Chirurgische ingrepen worden onder aseptische condities uitgevoerd op locatie 3.159 van de afdeling fysiologie. Dit protocol is reeds goedgekeurd en wordt toegepast in alle ischemische achterpootingrepen bij de afdeling Fysiologie

Sedatie en narcose dmv 0,01 mg/kg Temgesic s.c. (15-30 minuten voor de ingreep) en 3-4% isofluraan om het dier onder narcose te brengen en 2-2,5% isofluraan tijdens de ingrepen. Ingrepen worden gestart na negatieve reactie op pijnprikkel (ooglid- en voetzoolreflex) een rustige ademhaling en hartslag.

Als de rat onder narcose is worden de volgende stappen uitgevoerd:

- Stap I: Procedure pre-operatieve analyse
 - Fixeer de rat in supine positie met tape op de verwarmde operatieplaat (instelling 39.0°C)
 - Breng de rectumprobe voor infraroodlamp feedbacksysteem in (instelling 37°C)
 - Scheer de achterpoten (noodzakelijk voor de ingreep en de laser Doppler meeting)
 - Desinfecteer met jodium het middengedeelte van de linkerachterpoot en -lies
 - Voer de pre-operatieve Laser Doppler-meeting uit
- Stap II: Ligatie a. femoralis
 - Maak een incisie aan de mediale zijde van de linker dij vanaf het ligamentum inguinale tot net boven de patella
 - Prepareer met fijne pincetten de a. femoralis en de a. epigastrica vrij tussen de 'superficial circumflex' en de 'caudofemoralis' en scheidt de arterie van de vene en het zenuwweefsel.
 - Ligeer vervolgens de a. femoralis en de a. epigastrica distaal van de a. profunda femoris met zijde 5-0 en plaats 5 mm distaal hiervan een tweede ligatuur.
 - Sluit vervolgens de huid met afzonderlijke knoophechtingen (4-0 polysorp).
- Algemene stappen IV: post-operatieve analyse
 - Voer de post-operatieve Laser Doppler scan uit
 - Dien subcutaan Temgesic toe (0,1 mg/kg mbt de pijnbestrijding)
 - Laat het dier recoveren bij 37°C en voer het daarna af naar de huisvesting te CPV.

SOP2: Ischemische achterpoot model, analyse reperfusie

Sedatie en narcose dmv 0,01 mg/kg Temgesic s.c. (15-30 minuten voor de ingreep) en 3-4% isofluraan om het dier onder narcose te brengen en 2-2,5% isofluraan tijdens de ingrepen. Ingrepen worden gestart na negatieve reactie op pijnprikkel (ooglid- en voetzoolreflex), een rustige ademhaling en hartslag

Als het proefdier onder narcose is:

- Fixeer de rat in supine positie met tape op de verwarmde operatieplaat
- Breng de rectumprobe voor het feedbacksysteem in (instelling 37°C)
- Leg vervolgens de rat in de klimaatkamer
- Laat het proefdier acclimatiseren in de klimaatkamer van de Laser Doppler (ongeveer 10 minuten)
- Voer de Laser Doppler scan uit

SOP 3: Ischemische achterpoot model, afname bloedmonsters

De dieren zijn onder algehele narcose en deze ingreep vindt plaats direct na de Laser Doppler is uitgevoerd.

- Neem 150µl bloed af dmv punctie van de staartvene voor ELISA bepalingen

SOP 4: MRI onder anesthesie

Anesthesie: inleiding 3-4 % isofluraan in O₂ in isofluraan box, onderhoud aan snuitkapje 2.0-2.5 % isofluraan in O₂. Daarna wordt de staartvene gecanuleerd (20 Ga, venflon catheter). Hierna wordt het dier geplaatst in de proefdierhouder die uitgerust is met een warmtevoorziening en een ademhaling- en hartslagregistratie.

Totale MRI meettijd: max 2 uur

Net voor en tijdens de perfusie scans wordt Adenosine 0.3 mg/kg/min i.v. toegediend om de maximale vasodilatatie te bewerkstelligen. Tijdens de perfusie scans en angiogrammen wordt 0.1 mmol/kg Gd-DTPA (klinisch gebruikt) contrastmiddel in de staartvene geïnjecteerd.

Bijlage 2

Afwegen en toedienen van STZ

Inleiding:

Streptozocine (STZ) zal worden gebruikt om diabetes bij ratten te induceren. De leeftijd van de ratten zal tussen de 8 en 12 weken zijn. Belangrijk is dat de ratten een gewicht hebben tussen de 225 en 275 gram. Oudere ratten geven vaak problemen bij het injecteren, omdat de staarten stugger zijn door bindweefsel.

De STZ wordt omschreven als "harmful" en er is "limited evidence of a carcinogenic effect", volgens fabrikant Sigma Aldrich). De stof staat echter vermeld op de lijst van kankerverwekkende stoffen in Nederland. In dit protocol zal beschreven worden welke voorzorgsmaatregelen getroffen moeten worden.

Onderzoeker zal ervoor zorgen dat de stockoplossing (afwegen en oplossen) vers wordt bereid en dat aan de hand van het gewicht van de rat bekend is hoeveel microliters geïnjecteerd moet worden door de biotechnici. De STZ poeder (in epje met draaidop) zal in een gesloten container naar het CPV getransporteerd worden, alwaar de citraat buffer wordt toegevoegd.

Methode:

1. Weegprotocol:

Voorzorgsmaatregelen

- Laminar Air Flow kast
- Handschoenen
- Protectiebril
- Labjas
- FFP3 masker
- Onder werkveld een disposable absorberend matras

Met de beschermende maatregelen zoals hierboven beschreven zal de streptozocine uit het potje afgewogen worden en verdeeld worden in epjes (met schroefdop). Dit gebeurt in de LAF-kast van . Vervoer van STZ van vriezer () naar

() zal gebeuren in een afgesloten doos met teken "kankerverwekkende stof" erop. Na afloop van het afwegen zullen het absorberend matras, het FFP3 masker en de handschoenen als chemisch afval worden afgevoerd. Het werkblad zal met chloor worden gereinigd.

Indien er geknoeid wordt zal conform beschreven in het protocol "werken met cytostatica in het CPV" het gemorste materiaal opgeruimd worden met absorberend materiaal en nadien zal het werkblad nog 3x met schoonmaakoplossing worden gereinigd.

2. Oplossen stof:

Voorzorgsmaatregelen

- Laminar Air Flow kast
- Handschoenen
- Protectiebril
- Labjas
- FFP3 masker
- Onder werkveld een disposable absorberend matras

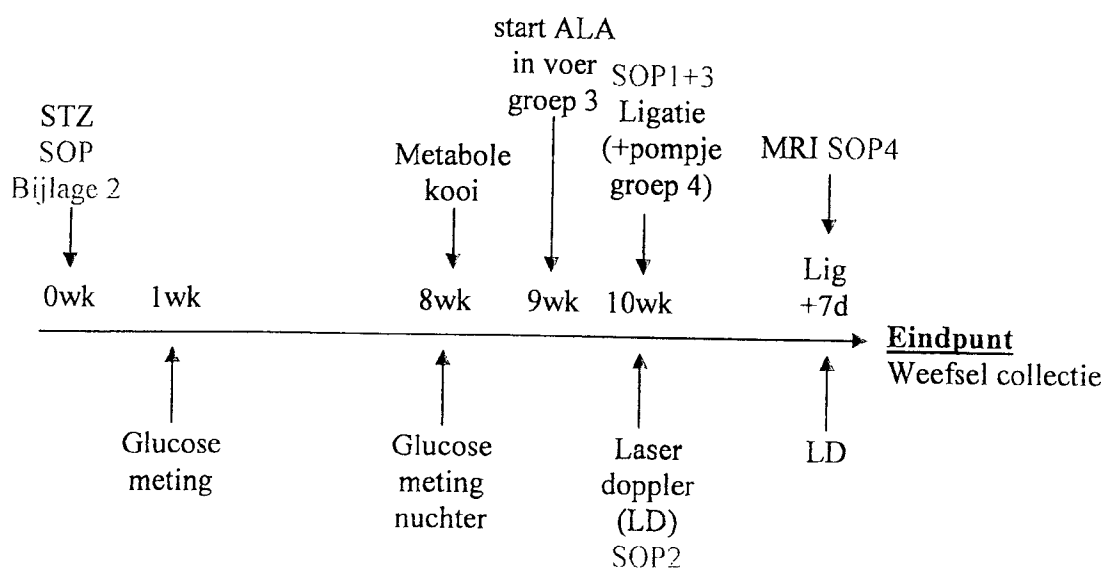
De met stof gevulde epjes zullen naar het CPV vervoerd worden in een afgesloten doos met het teken "kankerverwekkende stof" erop.

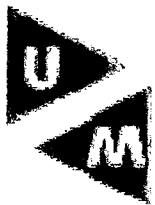
In de biohazardkast van het CPV zal de benodigde hoeveelheid natrium citraat worden toegevoegd, conform het protocol "werken met cytostatica in het CPV".

3.Injecteren STZ:

De injecties zullen door medewerkers van het CPV worden gedaan

- Fixeer het dier
- Desinfecteer de staart
- Injecteer de vloeistof in de staartvene
- Maak de staart schoon





University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon:

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 01-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Het effect van alfa-liponzuur op diabetes geïnduceerde gestoorde collateraal formatie in ratten*", is op de DEC vergadering van 25 februari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC vraagt zich af of de normaalwaarden niet uit de literatuur te halen zijn, dit zou één controlegroep schelen.
- De DEC merkt op dat de gewichtsafname (punt 9c) gerelateerd dient te worden aan de normale groeicurve, in plaats van ten opzichte van dag nul.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC het ongerief voor het verblijven in een metabole kooi, aan te passen in code 03.

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 2011-033, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

-

-

-

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
14-03-2011

Project: *Het effect van alfa-liponzuur op diabetes geïnduceerde gestoorde collateraal formatie in ratten.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

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

Secretariaat DEC-UM
T (043) 38 81108

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-033
Diersoort: rat
Aantal dieren: 48
Einddatum: 14-03-2015

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