

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR:2011-165

Versie 2006

Nieuw

Ontvangen: 05-12-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
16-12-2011	Nieuw / Herz. versie / Pilot

VROM/GGONR ³
IG 06-110

LNV/CBDNR ⁴

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	T

Budgetnummer	3098 3280B

Titel van het onderzoek:

Is RAGE-gemedieerde CML accumulatie in het vetweefsel in obese muizen betrokken bij het ontstaan van insuline resistentie en vasculaire disfunctie?

startdatum 01 januari 2012

einddatum ⁹ 01 januari 2013

Duur van de proef¹⁰: 4 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				Art.9	
4. overige uitvoerenden				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	
5.				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1	2	3	4	.	.	.
ctrl/exp/sham	Obese, RAGE knockout muis	Obese, Controle muis	Lean, RAGE knockout muis	Lean, Controle muis			
Diersoort	Muis	Muis	Muis	Muis			
Stam	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6			
Construct / mutatie ?	Lepr ^{db} -/- RAGE -/-	Lepr ^{db} -/- RAGE +/-	Lepr ^{db} +/- RAGE -/-	Lepr ^{db} +/- RAGE +/-			
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01			
Aantal	10	10	10	10			
Geslacht	V/M	V/M	V/M	V/M			
Dieren immuuncompetent ?	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸	Ja/nee ⁸			
Leeftijd/gewicht	10 weken	10 weken	10 weken	10 weken			
Doel van de proef *	31	31	31	31			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	01	01	01			
Anesthesie *	01	01	01	01			
Pijnbestrijding *	01	01	01	01			
Mate ongerief *	04	04	04	04			
Toestand dier einde exp*	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: Is RAGE-gemedieerde CML accumulatie in het vetweefsel in obese muizen betrokken bij het ontstaan van insuline resistentie en vasculaire disfunctie?

1. Doel van de proef.

Mensen met overgewicht hebben een verhoogd risico op het krijgen van suikerziekte (type 2 diabetes) en hart- en vaatziekten. Dit verhoogde risico is te wijten aan een verstoorde productie van ontstekingsstoffen in het vetweefsel van obese patiënten. Factoren die deze disregulatie van ontstekingsstoffen teweeg brengt, zijn grotendeels nog ongekend. Recent onderzoek op onze afdeling heeft aangetoond dat opstapeling van het gemodificeerde eiwit N^ε-(Carboxymethyl)lysine (CML) in het vetweefsel een belangrijke rol speelt bij het induceren van ontstekingsreacties in het vetweefsel. In een obese muizenmodel (DEC 2008-178 en DEC 2010-046) hebben wij aangetoond dat CML accumuleert in het vetweefsel van obese muizen en dat deze accumulatie via de receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) verloopt. Bovendien hebben wij in obese, RAGE deficiënte muizen aangetoond dat inhibitie van de CML accumulatie in het vetweefsel geassocieerd is met lagere productie van ontstekingsstoffen. Het ontbreken van RAGE is dus geassocieerd met een lagere CML accumulatie in het vetweefsel en lagere productie van ontstekingsstoffen. Onderzoek met gekweekte cellen heeft aangetoond dat deze ontstekingsstoffen geassocieerd zijn met markers van insuline resistentie en disfunctioneren van endotheelcellen (hart en bloedvaten). De ontstekingsstoffen die in het vetweefsel van obese patiënten verhoogd geproduceerd worden door de CML accumulatie, kunnen via de circulatie getransporteerd worden naar het hart, bloedvaten, spieren en lever, om aldus daar schadelijke effecten uit te oefenen. Deze CML-gemedieerde productie van ontstekingsstoffen kan dus betrokken zijn bij het ontstaan van insuline resistentie en hart- en vaatziekten.

In dit dierenexperimenteel onderzoek willen wij bestuderen of CML accumulatie in het vetweefsel van obese muizen betrokken is bij het ontstaan van insuline resistentie en hart- en vaatziekten. Bovendien willen wij nagaan of inhibitie van CML accumulatie (door deficiëntie van de receptor voor CML, nl RAGE) kan beschermen tegen het ontstaan van insuline resistentie en hart- en vaatziekten in obese muizen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

In Nederland heeft ongeveer 35% van de bevolking overgewicht, waarvan 12% leidt aan ernstige zwaarlijvigheid. Studies verwachten dat deze aantallen verder zullen stijgen. Omdat overgewicht en zwaarlijvigheid gepaard gaan met een verhoogd risico op het krijgen van insuline resistentie, type 2 diabetes en hart- en vaatziekten, zal het aantal mensen met deze complicaties ook stijgen. Het achterhalen van het mechanisme waarom obese patiënten een verhoogd risico hebben op het krijgen van deze complicaties is dan ook zeer belangrijk. In vorig onderzoek hebben wij aangetoond dat er een opstapeling van het gemodificeerde eiwit CML plaatsvindt in het vetweefsel van obese muizen en de receptor RAGE hierbij een belangrijke rol speelt. Deze CML opstapeling in het vetweefsel stimuleert vetcellen om schadelijke ontstekingsstoffen te produceren. In dit onderzoek willen wij bestuderen of CML-gemedieerde productie van ontstekingsstoffen in het vetweefsel betrokken zijn bij het ontstaan van insuline resistentie, type 2 diabetes en hart- en vaatziekten. Dit onderzoek zal dus bijdragen aan het ophelderen van het mechanisme dat aan de basis ligt van obesitas-geassocieerde complicaties. Resultaten van dit onderzoek en opheldering van het mechanisme zal in de toekomst een belangrijk aangrijpingspunt vormen om therapieën te ontwikkelen voor de bestrijding van obesitas-geassocieerde complicaties.

3. Alternatieven

Het ontstaan van insuline resistentie, type 2 diabetes en hart- en vaatziekten in mensen met overgewicht is een complex mechanisme waarbij verschillende organen (vetweefsel, lever, spierweefsel, hart, en bloedvaten) bij betrokken zijn. Het ontstaan van insuline resistentie (en type 2 diabetes) is een complex proces, waarbij de spieren en vetweefsel niet goed reageren op insuline/glucose levels in het bloed, bovendien kan de productie en opslag van glucose in de lever verstoord zijn. De wisselwerking tussen vetweefsel/spierweefsel/lever bij het ontstaan van "whole body" insuline resistentie kan dus niet bestudeerd worden mbv celexperimenten en kan enkel bestudeerd worden in proefdieren. Ook het ontstaan van hart- en vaatziekten is een complex proces waarbij verschillende celtypen (endotheelcellen, gladde spiercellen) betrokken zijn. De reactiviteit van een bloedvat wordt bepaald door de samenwerking tussen endotheelcellen en gladde spiercellen en kan dus enkel bestudeerd worden in een intact

bloedvat (afkomstig van een proefdier). Bovendien willen wij bestuderen of de receptor RAGE betrokken is bij het ontstaan van insuline resistentie (type 2 diabetes) en hart- en vaatziekten. Dit kan enkel bestudeerd worden in een dierenmodel van deficiënt is voor RAGE.

4. Ethische afweging

Obesitas is een groeiend gezondheidsprobleem. Het aantal mensen dat aan zwaarlijvigheid en obesitas lijdt en aan obesitas-geassocieerde complicaties zoals insuline resistentie, type 2 diabetes en hart- en vaatziekten is de laatste jaren aanzienlijk toegenomen en verwacht wordt dat dit aantal verder zal stijgen. Dit onderzoek tracht het achterliggende mechanisme van obesitas-geassocieerde complicaties te achterhalen. Onze hypothese is dat CML accumulatie in het vetweefsel van mensen met overgewicht leidt tot een verhoogde productie van ontstekingsstoffen, die vervolgens bijdragen tot het ontstaan van insuline resistentie en hart- en vaatziekten. Resultaten van dit onderzoek en verheldering van het achterliggende mechanisme kunnen in de toekomst bruikbaar zijn voor de patiëntenzorg. Mogelijke interventiestrategieën die gebruikt kunnen worden zijn o.a. inhibitie van de CML accumulatie in het vetweefsel door een remmer van de CML vorming. Omdat dit onderzoek de basis vormt voor verdere interventiestudies die mogelijk in de toekomst in de patiëntenzorg toegepast kunnen worden, achten wij het uitvoeren van dit dierenexperimenteel onderzoek, en het hiermee gepaard gaande ongerief voor de proefdieren, aanvaardbaar.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Overgewicht en obesitas zijn een ernstig gezondheidsprobleem en gaat gepaard met een verhoogd risico op het krijgen van insuline resistentie, type 2 diabetes en hart- en vaatziekten. Het mechanisme dat dit verhoogde risico verklaart is nog niet duidelijk in kaart gebracht. Onderzoek heeft aangetoond dat het vetweefsel niet enkel verantwoordelijk is voor opslag van energie in de vorm van vetten, maar dat het vetweefsel ook een belangrijke endocriene functie heeft. Het vetweefsel is namelijk verantwoordelijk voor de productie van pro- en anti-inflammatoire cytokines, adipokines genaamd. Onder normale omstandigheden is de productie en secretie van deze ontstekingsstoffen goed gereguleerd. Overgewicht en obesitas wordt echter gekenmerkt door een verstoorde productie en secretie van adipokines, dat resulteert in een verhoogde productie van pro-inflammatoire adipokines en een verlaagde productie van anti-inflammatoire cytokines. Deze disbalans zorgt voor het ontstaan van een continue ontstekingsreactie in het vetweefsel van mensen met overgewicht. Factoren in het obese vetweefsel die aanleiding geven tot de verstoorde productie en secretie van ontstekingsstoffen zijn grotendeels ongekend. Wij hebben aangetoond dat opstapeling van het gemodificeerde eiwit N^ε-(Carboxymethyl)lysine (CML) in het vetweefsel bij obesitas aanleiding geeft tot een verstoorde productie en secretie van ontstekingsstoffen. CML opstapeling in het vetweefsel wordt enerzijds veroorzaakt door een verhoogde endogene vorming van CML, en anderzijds, door een verhoogde opname van circulerend CML via de receptor voor advanced glycation endproducts (RAGE) (DEC 2010-046).

De disregulatie van adipokines in obese individuen is geassocieerd met een verhoogd risico op het krijgen van insuline resistentie en hart- en vaatziekten door o.a. het induceren van chronische ontstekingsreacties en het activeren van endotheelcellen. Deze *in vitro* experimenten met endotheelcellen en vetcellen laten dus zien dat adipokines mogelijk betrokken zijn bij het ontwikkelen van insuline resistentie en hart- en vaatziekten.

In deze dierenexperimentele studie willen wij onderzoeken of CML-gemedieerde disregulatie van adipokines in obese muizen geassocieerd is met het ontstaan van insuline resistentie en hart- en vaatziekten. Bovendien willen wij nagaan of deficiëntie van RAGE, dat vervolgens leidt tot inhibitie van CML accumulatie in het vetweefsel en normale productie van adipokines, geassocieerd is met verbeterde insuline resistentie en hart- en vaatziekten. Dit onderzoek zal verder inzicht verschaffen in de mechanismen waarlangs obesitas leidt tot het ontstaan van obesitas-geassocieerde complicaties zoals insuline resistentie en hart- en vaatziekten. Opheldering van dit mechanisme zal de basis vormen voor interventiestudies teneinde het verhoogde risico op complicaties bij obese individuen te verlagen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit onderzoek maakt deel uit van het project "Is AGE/ALE N^ε-(Carboxymethyl)lysine a missing link between obesity and vascular complications by the dysregulation of adipocytokines?" dat gefinancierd wordt het
) Het huidige voorstel is intern beoordeeld en goedgekeurd door

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

De gewenste dierensoort om de rol van RAGE-gemedieerde CML accumulatie in het vetweefsel bij het ontstaan van insuline resistentie (type 2 diabetes) en vasculaire disfunctie te bestuderen is de muis.

Er wordt gewerkt met:

$RAGE^{-/-}/Lepr^{Db/-}$ muizen

$RAGE^{+/+}/Lepr^{Db/-}$ muizen

$RAGE^{-/-}/Lepr^{Db+/+}$ muizen

$RAGE^{+/+}/Lepr^{Db+/+}$ muizen

Deze muizen zijn afkomstig van een kruising tussen $RAGE^{-/-}$ muizen (oorspronkelijk afkomstig van Universiteit van Heidelberg) en $Lepr^{Db/-}$ muizen (oorspronkelijk afkomstig van UM). Deze kruising is reeds 2 jaar geleden bij IVC afdeling van het UM opgestart en verloopt prima. Met behulp van genotypering van de nestjes worden de gewenste genotypes geselecteerd.

De muizen zullen na beëindiging van de proef ge-euthanaseert en gedissecteed worden. Bloedmonsters worden afgenomen voor directe bepalingen en zullen opgeslagen worden voor latere analyses. Verschillende weefsels (o.a. vetweefsel, lever, spier, hart, nier en aorta) zullen verzameld worden voor enerzijds verdere analyse van de insuline resistentie van de weefsels en anderzijds voor bepaling van de reactiviteit van de aorta met behulp van de myograaf.

7b. Sexe

Omwille van het kleine aantal muizen met het juiste genotype dat verkregen wordt uit de fok, wordt geopteerd om beide geslachten te gebruiken. Er zal gestreefd worden om in elke groep dezelfde verdeling M/V te behouden om vergelijking tussen de 2 groepen mogelijk te maken.

7c. Aantallen

In de studie beschreven door Harcourt B et al. (Kidney International, 2011) is er gebruik gemaakt van obese muizen en $RAGE$ knockout muizen die een hoog vet dieet gedurende enkele weken kregen toegediend. Op basis van de resultaten beschreven in deze studie heb ik volgende powerberekening gebaseerd:

Plasma insuline obese groep (enkel mannelijke muizen) = 1.69 ± 0.7 ng/ml

Plasma insuline obese, $RAGE^{-/-}$ groep (enkel mannelijke muizen) = 3.36 ± 1.0 ng/ml

Verskil in plasma insuline concentratie tussen beide groepen = $49.7\% [100\% - (1.69/3.36 * 100)]$

Gemiddelde spreiding plasma insuline concentratie = $35.3\% [1/2 * (0.7/1.69 + 1.0/3.36)]$

Voor een betrouwbaarheid van de toets van $\alpha=0.05$ en een onderscheidingsvermogen van $\pi=80\%$ is $F_{0.50} = 15.7$

Dit wil zeggen: $n=15.7 * (\sigma/\gamma)^2 = 15.7 * (35.3/49.7)^2 = 7.9$ muizen

Rekening houdend met een uitval van 10% en rekening houdend met het feit dat wij verwachten dat de spreiding van ons experiment zal toenemen omwille van het gebruik van beide geslachten, worden in totaal **10 muizen per groep** aangevraagd.

Rekening houdend met een 10% hogere spreiding van de analyse door gebruik te maken van beide geslachten, zou de spreiding 38.8% bedragen. Dit wil dus zeggen dat bovenstaande berekening zou zijn: $n=15.7 * (\sigma/\gamma)^2 = 15.7 * (38.8/49.7)^2 = 9.6$ muizen. Daarom achten wij het gebruik van 10 muizen per groep verantwoord.

$RAGE^{-/-}/Lepr^{Db/-}$ muizen: N=10

$RAGE^{+/+}/Lepr^{Db/-}$ muizen: N=10

$RAGE^{-/-}/Lepr^{Db+/+}$ muizen: N=10

$RAGE^{+/+}/Lepr^{Db+/+}$ muizen: N=10

5 Dierproef

8. Experiment

We werken met 4 groepen muizen:

- Groep 1 = $RAGE^{-/-}/Lepr^{Db-/-}$ muizen (n=10) → controlegroep 3 = $RAGE^{-/-}/Lepr^{Db+/+}$
- Groep 2 = $RAGE^{+/+}/Lepr^{Db-/-}$ muizen (n=10) → controlegroep 4 = $RAGE^{+/+}/Lepr^{Db+/+}$

Elke muis wordt geïncubeerd in de 4 afzonderlijke deelexperimenten. Tussen de deelexperimenten is er een rustpauze van 1 week.

Experiment 1: Glucose tolerantie test (DAG 1)

Na een periode van vasten (overnacht, 16h), zal door middel van een **venepunctie** een kleine druppel bloed afgenomen worden om de nuchtere glucose concentratie te bepalen. Deze concentratie wordt bepaald met behulp van een glucosemeter. Bovendien zal een kleine hoeveelheid bloed (ongeveer 30 μ l) via **deze punctie** verzameld worden met behulp van een heparine-gecoat capillairsysteem om later nuchtere insuline concentraties in te meten. Op T=0 krijgt de muis een ip injectie van glucose (2g/kg bodyweight). Na deze injectie zal op verschillende tijdstippen glucose bepaald worden (via bloeddruuppel uit de **venepunctie**, mbv glucosemeter) en zal via dezelfde punctie bloed verzameld worden mbv capillairsysteem om later insuline concentraties te bepalen. De tijdstippen waarop bloed verzameld zal worden is 5, 15, 30, 60, 90 en 120 min. Na T=120 min zal de muis terug overgebracht worden naar zijn kooi voor een herstelperiode van 1 week.

Experiment 2: Insuline tolerantie test (DAG 8)

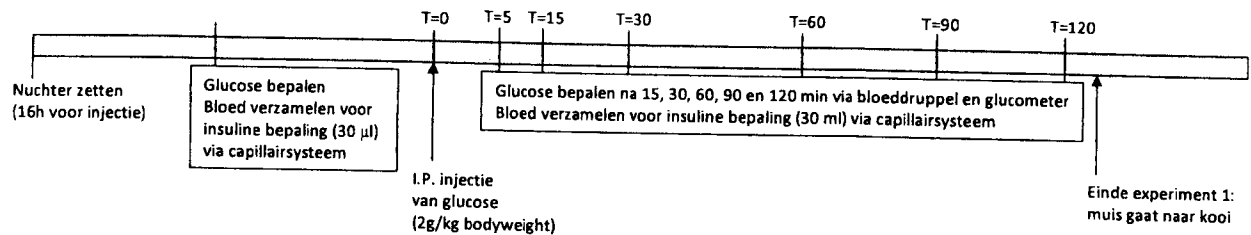
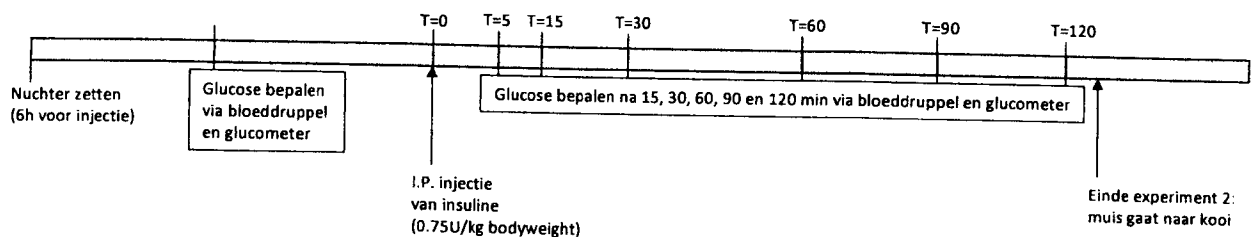
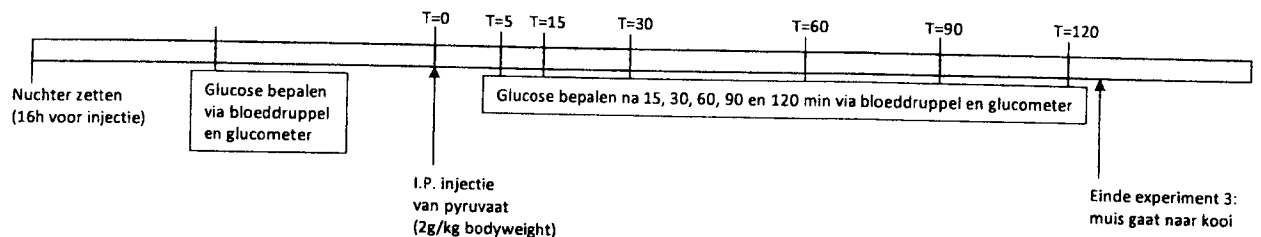
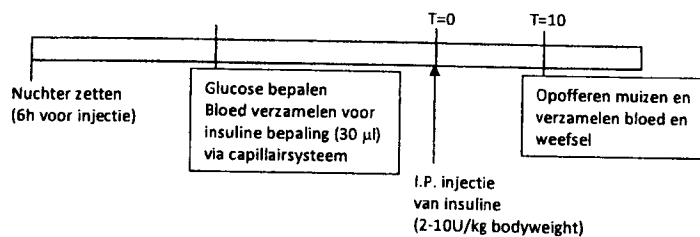
Na een periode van vasten (6h), zal door middel van een **venepunctie** een kleine druppel bloed afgenomen worden om de nuchtere glucose concentratie te bepalen. Deze concentratie wordt bepaald met behulp van een glucosemeter. Op T=0 krijgt de muis een ip injectie van insuline (0.75U/kg bodyweight). Na deze injectie zal op verschillende tijdstippen glucose bepaald worden (via bloeddruuppel uit de **venepunctie**, mbv glucosemeter). De tijdstippen waarop bloed verzameld zal worden is 5, 15, 30, 60, 90 en 120 min. Na T=120 min zal de muis terug overgebracht worden naar zijn kooi voor een herstelperiode van 1 week.

Experiment 3: Pyruvaat tolerantie test (DAG 16)

Na een periode van vasten (overnacht, 16h), zal door middel van een **venepunctie** een kleine druppel bloed afgenomen worden om de nuchtere glucose concentratie te bepalen. Deze concentratie wordt bepaald met behulp van een glucometer. Op T=0 krijgt de muis een ip injectie van pyruvaat (2h/kg bodyweight). Na deze injectie zal op verschillende tijdstippen glucose bepaald worden (via bloeddruuppel uit de **venepunctie**, mbv glucosemeter). De tijdstippen waarop bloed verzameld zal worden is 5, 15, 30, 60, 90 en 120 min. Na T=120 min zal de muis terug overgebracht worden naar zijn kooi voor een herstelperiode van 1 week.

Experiment 4: "ante-mortem" insuline injectie

Na een periode van vasten (6h), zal door middel van een **venepunctie** een kleine druppel bloed afgenomen worden om de nuchtere glucose concentratie te bepalen. Deze concentratie wordt bepaald met behulp van een glucometer. Op T=0 krijgt de muis een ip injectie van insuline (2-10U/kg bodyweight). 10 min na deze injectie zal de muis opgeofferd worden en zullen bloed en weefsels verzameld worden. Bij het opofferen wordt eveneens de aorta van de muizen geïsoleerd om vasoreactiviteit mbv myograaf te testen.

EXPERIMENT 1: DAG 1 (glucose tolerantie test)**EXPERIMENT 2: DAG 8 (insuline tolerantie test)****EXPERIMENT 3: DAG 16 (pyruvaat tolerantie test)****EXPERIMENT 4: DAG 24 (opofferen muizen na IP insuline injectie)****9. Experimentele condities****9a. Anesthesie**

Bij het uitvoeren van dit experiment wordt geen anesthesie toegepast.

9b. Pijnbestrijding

Het ip injecteren van glucose/insuline/pyruvaat wordt uitgevoerd door het starten van dit experiment, zullen ip injecties en bloedafname via vena saphena magna punctie aangeleerd worden. Pijnbestrijding is niet van toepassing tijdens het uitvoeren van het experiment.

Vóór

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie vindt plaats door CO₂/O₂ gevolgd door CO₂.

Er worden geen ernstige complicaties verwacht bij dit experiment. Uit vorig dierenexperimenteel onderzoek (DEC 2010-046) is gebleken dat RAGE^{-/-}/Lepr^{Db-/-} en RAGE^{+/-}/Lepr^{Db-/-} muizen weinig ongerief zullen ondervinden omwille van hun genotype. Dit muizenmodel wordt wel gekenmerkt door zwaarlijvigheid. De muizen zullen dus vanaf +/- 6 weken zwaarlijvig worden, maar zullen in de leeftijd 8-14 weken weinig last ondervinden van hun zwaarlijvigheid. Er worden geen extreme morbiditeit/mortaliteit in deze muizen verwacht. De muizen zullen ip geïnjecteed worden met natuurlijke suikers glucose en pyruvaat, en met insuline. Deze stoffen zijn geen schadelijke stoffen, echter afhankelijk van de gebruikte concentratie/dosis van deze stoffen, kunnen deze stoffen ongerief voor de muizen met zich mee brengen.

Humane eindpunten voor dit onderzoek zijn de afwezigheid van exploratief gedrag, houding, niet meer eten/drinken, niet meer produceren van urine/feces, niet meer verzorgen van de vacht, algemene verzorgingstoestand. Indien deze humane eindpunten optreden, of indien er toch een ziektebeeld ontwikkelt waarbij de muizen zichtbaar ernstig lijden, moet contact genomen worden met de verantwoordelijk onderzoeker . Indien bovenstaande humane eindpunten optreden (of een combinatie van bovenstaande eindpunten) zal het experiment vroegtijdig beëindigd worden, waarbij terminale anesthesie dmv verbloeding onder anesthesie plaatsvindt.

10a. Ongerief

Het experiment bestaat uit 4 opeenvolgende deelexperimenten, waarbij bij elk experiment de muis een ip van een natuurlijk voorkomend product (nl. glucose, insuline of pyruvaat) injectie toegediend krijgt. Tijdens de deelexperimenten wordt op geregelde tijdstippen een bloeddruppel via **venepunctie** verzameld om glucoseconcentratie te bepalen (gebeurt mbv glucosemeter). Enkel tijdens het eerste deelexperiment wordt naast de bloeddruppel ook nog kleine hoeveelheid bloed (30 µl per keer) verzameld om later insulineconcentraties te bepalen. Tussen de deelexperimenten is telkens een periode van 1 week ingepland om de muizen te laten bekomen van vorige injectie. Omwille van de herhaaldelijke ip injecties en bloedafnames wordt het ongerief voor de muis geschat op code 04.

Handeling	Duur	Frequentie	Ongerief
IP injectie	1 min/injectie	4x (tussen IP injecties is er een herstelperiode van 1 week)	04
Venepunctie	1 min/incisie	4x	04
Bloeddruppel verzamelen	30s/druppel	19x (verspreid over 4 deelexperimenten, dus over 4 weken)	03

Per deelexperiment moet er 1 **venepunctie** uitgevoerd worden. Deze incisie kan vervolgens gebruikt worden om bloeddruppel te verzamelen op de verschillende tijdstippen. Na 1 week herstelperiode is deze incisie hersteld, en moet een nieuwe **venepunctie** uitgevoerd worden voor het volgende deelexperiment. Er wordt dus niet telkens een nieuwe **venepunctie** uitgevoerd bij elke bloedafname. Dus eigenlijk moet er 4x een **venepunctie** uitgevoerd worden.

10b. Welzijnsevaluatie

Tijdens het uitvoeren van het experiment zal het welzijn en de algemene toestand van de muizen geëvalueerd worden door medewerkers van CVP en door de onderzoekers. Uit vorige experimenten (DEC 2010-046) is gebleken dat het genotype $RAGE^{-/-}/Lepr^{Db^{-/-}}$ geen ongerief ondervindt. Deze muizen hebben wel het obese genotype en zullen dus vanaf +/- 6 weken dikker worden tov normale muizen. Maar uit vorige experiment is gebleken dat de muizen van 8-14 weken geen ongerief ondervinden van hun zwaarlijvige genotype. Echter, de algemene toestand wordt goed opgevolgd.

11. Verzorging en huisvesting

De muizen zullen onder normale omstandigheden en in groepsverband gehuisvest worden. Verzorging van de muizen gebeurt volgens standaard richtlijnen van UM). Bij calamiteiten dient gewaarschuwd worden. Zij heeft eveneens de verantwoordelijkheid over de dieren in proef. De experimenten worden uitgevoerd op

12. Deskundigheid

De experimenten worden uitgevoerd door [] (beide artikel 9 certificaat). [] heeft reeds goede ervaringen op het gebied van dierenexperimenteel onderzoek en is zeer bekwaam in het uitvoeren en handelen van dierenstudies. In de aanloop van dit experiment wordt IP injectie en vena saphena magna punctie aangeleerd. Hiervoor is reeds een werkprotocol goedgekeurd (2009-165).

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijgevoegde SOPs voor glucose tolerantie test (1), insuline tolerantie test (2), pyruvaat tolerantie test (3) en "ante-mortem" insuline injectie (4).

Relevante literatuur

Harcourt B et al. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity, *Kidney International* (2011) 80, 190–198

Experiment 1: SOP Glucose tolerantie test (GTT)

- De muizen krijgen gedurende een bepaalde periode normaal voedsel
- Men laat de muizen gedurende 16 uren vasten: dus 's avonds worden de muizen overgebracht naar een nieuwe kooi met alleen water en geen voer, en 's anderdaags in de ochtend wordt de GTT uitgevoerd.
- Voor de test worden alle muizen gewogen.
- Via de staartvene wordt ongeveer 30 microliter bloed afgenomen (mbv heparine-gecoat capillairsysteem). Het bloed wordt onmiddellijk op ijs wordt gezet. Eveneens wordt de nuchtere glucoseconcentratie in het bloed bepaald (mbv glucosemeter)
- Met behulp van een injectiespuit (naald 0.4x19 mm) wordt 2 gram glucose/kg lichaamsgewicht intraperitoneaal ingespoten.
- De muizen worden elk overgebracht in een aparte kooi (zonder voer, met alleen water).
- Na 15, 30, 60, 90 en 120 minuten wordt bloed verzameld via de staartvene (30 µl per tijdstip) en wordt glucose concentratie, samples op ijs bewaren.
- De muizen gaan terug naar hun oude kooi (met voer en water).

Experiment 2: SOP Insuline tolerantie test (ITT)

- De muizen krijgen gedurende een bepaalde periode normaal voedsel
- Men laat de muizen gedurende 6 uren vasten: dus 's morgens worden de muizen overgebracht naar een nieuwe kooi met alleen water en geen voer en 's middags wordt de ITT uitgevoerd.
- Voor de test worden alle muizen gewogen.
- De nuchtere glucoseconcentratie wordt in een bloeddruppel (afkomstig van staartveen incisie) bepaald (mbv glucosemeter).
- Met behulp van een injectiespuit (naald 0.4x19 mm) wordt 0.75 U insuline/kg lichaamsgewicht intraperitoneaal ingespoten.
- De muizen worden elk overgebracht in een aparte kooi (zonder voer, met alleen water).
- Na 15, 30, 60, 90 en 120 minuten wordt bloed verzameld via de staartvene (30 µl per tijdstip) en wordt glucose concentratie, bloed samples op ijs bewaren.
- De muizen gaan terug naar hun oude kooi (met voer en water).

Experiment 3: SOP Pyruvaat tolerantie test (PTT)

- De muizen krijgen gedurende een bepaalde periode normaal voedsel
- Men laat de muizen gedurende 16 uren vasten: dus 's avonds worden de muizen overgebracht naar een nieuwe kooi met alleen water en geen voer, en 's anderdaags in de ochtend wordt de PTT uitgevoerd.
- Voor de test worden alle muizen gewogen.
- De nuchtere glucoseconcentratie wordt in een bloeddruppel (afkomstig van staartveen incisie) bepaald (mbv glucosemeter).
- Met behulp van een injectiespuit (naald 0.4x19 mm) wordt een 2 gram pyruvaat/kg lichaamsgewicht intraperitoneaal ingespoten.
- De muizen worden elk overgebracht in een aparte kooi (zonder voer, met alleen water).
- Na 15, 30, 60, 90 en 120 minuten wordt bloed verzameld via de staartvene (30 µl per tijdstip) en wordt glucose concentratie, bloed samples op ijs bewaren.
- De muizen gaan terug naar hun oude kooi (met voer en water).

Experiment 4: SOP "ante-mortem" insuline injectie

- De muizen krijgen gedurende een bepaalde periode normaal voedsel
- Men laat de muizen gedurende 6 uren vasten: dus 's morgens worden de muizen overgebracht naar een nieuwe kooi met alleen water en geen voer.
- Voor de test worden alle muizen gewogen.

- De nuchtere glucoseconcentratie wordt in een bloeddruuppel (afkomstig van staartveen incisie) bepaald (mbv glucosemeter).
- Met behulp van een injectiespuit (naald 0.4x19 mm) wordt 2-10 U insuline/kg lichaamsgewicht intraperitoneaal ingespoten.
- 10 min na injectie van de insuline wordt de muis opgeofferd en wordt bloed en verschillende weefsels verzameld voor verdere analyses.

Aan: :

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-Maastricht
20-12-2011

Project: *Is RAGE-gemedieerde CML accumulatie in het vetweefsel in obese muizen betrokken bij het ontstaan van insuline resistentie en vasculaire disfunctie?*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO): :Secretariaat DEC-UM
T 043

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, 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:** 2011-165**Diersoort:** muis**Aantal dieren:** 40**Einddatum:** 16-12-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM

U