

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie nov. 2005

NIEUW**DECNR: 2011-073****Ontvangen: 13 mei 2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
27-05-2011	Nieuw

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

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.			Skeletspier metabolisme
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	----------------------------

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

Budgetnummer 503220-10008456

Titel van het onderzoek:

Heeft de verminderde mitochondriële capaciteit in Type 2 Diabetes een verhoogde ATP productie door glycolyse of een versnelde en verhoogde spiervermoeidheid tijdens inspanning tot gevolg?

startdatum 01-juni-2011

einddatum⁹ 01-sept-2013Duur van de proef¹⁰: 1 dag

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

Diergroep	1	2	3	4			
ctrl/exp/sham	exp	exp	ctrl	ctrl			
Diersoort	02	02	02	02			
Stam	ZDF fa/fa	ZDF fa/fa	ZDF fa/+	ZDF fa/+			
Construct / mutatie ?	nee	nee	nee	nee			
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02			
Aantal	8	8	8	8			
Geslacht	man	man	man	man			
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	Ja	Ja			
Leeftijd/gewicht	14 weken	14 weken	14 weken	14 weken			
Doel van de proef *	33	33	33	33			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	01	01	01			
Anesthesie *	04	04	04	04			
Pijnbestrijding *	01	01	01	01			
Mate ongerief *	02	02	02	02			
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01			

2 Verantwoording

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

Titel: Heeft de verminderde mitochondriële capaciteit in Type 2 Diabetes een verhoogde ATP productie door glycolyse of een versnelde en verhoogde spiervermoeidheid tijdens inspanning tot gevolg?

1. Doel van de proef.

Een belangrijk kenmerk van patiënten met Type 2 Diabetes is een verminderde mitochondriële capaciteit (1). Mitochondria spelen een belangrijke rol in het omzetten van de energie opgeslagen in nutriënten (glucose + vetzuren) in energie beschikbaar voor andere cellulaire processen (ATP). In een leidende hypothese betreffende de ontwikkeling van diabetes heeft verminderde mitochondriële capaciteit een belangrijke rol, namelijk als een van de oorzaken voor de ophoping van vetzuren in de spiercel, waardoor het insuline pathway wordt verstoord (1).

Naast mitochondria kunnen spiercellen ook door middel van glycolyse een gedeelte van de energie opgeslagen in glucose gebruiken voor de productie van ATP. Een andere hypothese betreffende het effect van de verminderde mitochondriële capaciteit in Type 2 Diabetes is dat, ter compensatie, tijdens inspanning een verhoogde ATP productie door glycolyse zal plaatsvinden (2). Een verhoogde glycolyse flux zal de glucose behoefte van de cel ook verhogen en dit zou een deel de effecten van de insuline resistentie van de spiercellen kunnen compenseren. Echter, het is ook mogelijk dat de verminderde mitochondriële capaciteit niet wordt gecompenseerd door een verhoogde glycolyse flux. In dit geval is de ATP productie capaciteit van de cel lager tijdens inspanning waardoor er in een eerder stadium spiervermoeidheid zal optreden. Op dit moment is onduidelijk wat het effect van de verminderde mitochondriële capaciteit in Type 2 Diabetes is op de glycolyse flux of spiervermoeidheid tijdens inspanning. In deze studie willen wij dit effect onderzoeken.

In deze studie willen we door middel van *in vivo* nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectroscopy) bepalen of er in een diermodel voor Type 2 Diabetes een verhoogde glycolyse flux is tijdens inspanning of dat de verminderde capaciteit voor de productie van ATP leidt tot een hoger niveau van spiervermoeidheid (verminderde krachtproductie).

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Diabetes is een ziekte die in de westerse samenleving epidemische proporties begint aan te nemen. Momenteel lijden ongeveer 246 miljoen mensen aan deze aandoening en verwacht wordt dat dit cijfer gaat stijgen tot ongeveer 380 miljoen in 2025. Van het totaal aantal diabetes patiënten lijdt ongeveer 85-95% aan type 2 diabetes.

Het betreft hier fundamenteel onderzoek naar de gevolgen van Type 2 Diabetes op het functioneren van skeletspier. Op dit moment is nog onduidelijk wat de effecten van de verminderde mitochondriële functie op het functioneren van spieren is. Verwacht wordt dat een beter inzicht in deze effecten op den duur kan leiden tot het ontwikkelen van betere therapieën om de gevolgen van type 2 diabetes te bestrijden en uiteindelijk te voorkomen.

3. Alternatieven

Een mogelijkheid alternatief is om dit onderzoek uit te voeren in mensen. Echter, type 2 diabetes patiënten hebben vaak een sterk wisselende presentatie van de ziekte. Daarnaast is het erg moeilijk om activiteitsniveau te matchen tussen diabetes patiënten en controles. Een andere complicatie bij een humane studie is dat het spieractivatie patroon (motor unit rekrutering) in een mens tijdens een vrijwillig inspanningsprotocol varieert (tussen proefpersonen en gedurende het protocol). Hierdoor

wordt een goede analyse van de experimentele data verkregen tijdens vrijwillige inspanning in mensen onmogelijk. Een alternatief is om de frequentie van spierexcitatie van buiten op te leggen. In een rat is dit mogelijk door het stimuleren van de motorzenuw met 2 bipolaire elektroden.

Daarnaast is voor deze studie zeer waardevol om na stimulatie spierbiopten te nemen om deze te analyseren op glycogeen verbruik, vascularisatie en de concentratie van lactaat transporters (MCT 1 en 4). Voor het betrouwbaar bepalen van deze parameters is het noodzakelijk de analyse uit te voeren over een groot gedeelte van de spier. Dit is in een humane studie het best te benaderen door het nemen van meerdere (>3) spierbiopten op verschillende locaties en dit is een grote belasting voor de proefpersonen.

In vitro onderzoek in cellijnen (myotubes) is niet mogelijk omdat deze wat betreft de spiercontractie, het ontwikkelen van spierversmoeidheid en zuurstoftransport de *in vivo* condities nog niet goed genoeg benaderen.

Binnen de onderzoekslijn van de wordt een computer model ontwikkeld voor de analyse van skeletspier metabolisme. Op dit moment is het huidige model nog niet goed genoeg gevalideerd om te dienen als alternatief voor een dierproef. Echter de experimentele data die tijdens deze studie wordt verkregen, kan in de toekomst wel gebruikt worden voor validatie van dit model. Verwacht wordt dat hierdoor op termijn deze studie kan bijdragen aan de vermindering en verfijning van dierexperimenten. Om de redenen hierboven beschreven achten de onderzoekers het noodzakelijk voor deze studie gebruik te maken van een experiment met dieren.

4. Ethische afweging

De voorgestelde proef moet bijdragen aan een beter begrip van de effecten van een verminderde mitochondriële functie in type 2 diabetes op het functioneren van de spier. Inzicht in deze effecten is noodzakelijk om het ontwikkelen van nieuwe therapieën om deze om de gevolgen van type 2 diabetes te bestrijden en uiteindelijk te voorkomen. Gegeven de wereldwijd toenemende incidentie van het aantal type 2 diabetes patiënten en de sociaal – economische problemen die hierdoor ontstaan, zijn de onderzoekers van mening dat de fundamentele kennis die met deze studie verkregen wordt opweegt tegen het matig ongerief dat de gebruikte proefdieren ondervinden.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

De laatste jaren is er veel discussie over de oorzaken en effecten van type 2 diabetes. Type 2 diabetes wordt gekenmerkt door insuline resistentie in weefsels zoals lever, vet en skeletspier. Skeletspier weefsel is een van de voornaamste organen die glucose opnemen in respons tot een verhoogde insuline concentratie (3). Skeletspier weefsel wordt daarom beschouwd als een van de belangrijke organen betrokken bij de ontwikkeling van type 2 diabetes. Een leidende hypothese binnen het onderzoeksveld is dat een verminderde mitochondriële capaciteit bijdraagt aan de ontwikkeling van insuline resistentie (1). Binnen de

van de faculteit TU/e, wordt deze hypothese intensief onderzocht. (Zie bijv., DEC-2009-123). Dit onderzoek heeft zich in het verleden voornamelijk gericht op het detecteren van *in vivo* mitochondriële dysfunctie en het achterhalen van de oorzaken hiervan. In deze nieuwe studie willen we onderzoeken wat de effecten zijn van de verminderde mitochondriële functie op de glycolyse flux en de ontwikkeling van spiervermoeidheid tijdens inspanning.

Een belangrijke functie van mitochondria is het omzetten van de chemische energie opgeslagen in glucose en vetzuren in ATP (de energiebron voor andere cellulaire processen). Naast synthese door mitochondria kunnen spiercellen ook glycolyse gebruiken voor de productie van ATP. Een mogelijk gevolg van de verminderde mitochondriële capaciteit is dat er tijdens inspanning een verhoogde glycolytische flux plaatsvindt in de spiercellen. Het is bekend dat deze compensatie optreedt in patiënten met metabole spierziekten (2), maar of dit ook het geval is in type 2 diabetes is onduidelijk. Een verhoogde glycolyse flux zou het gevolg kunnen zijn van een verandering in concentraties van glycolyse-eiwitten (4), of een verhoging van de concentratie van regulerende metabolieten (ADP, Pi) tijdens inspanning (2). Echter is ook bekend als gevolg van insuline resistentie van het spierweefsel de glucose en glycogeen concentratie in spieren verlaagd is bij type 2 diabetes (5). Deze verlaagde glucose en glycogeen concentratie hebben weer een deactiverend effect op de glycolyse flux. Een andere factor die glycolyse juist zou kunnen remmen in type 2 diabetes is een verhoogde citrate concentratie in het cytoplasma (6). Op dit moment is niet duidelijk welk van deze stimulerende en deactiverende effecten dominant is en of er dus compensatie optreedt of niet. In het geval er geen compensatie optreedt door een verhoogde glycolyse flux is er een vermindering in de totale cellulaire ATP productie capaciteit. In dit geval is het waarschijnlijk dat het proces van spiervermoeidheid (verminderde krachtproductie) eerder en sterker op zal treden tijdens inspanning.

Doormiddel van magnetic resonance spectroscopy (MRS)

Een hogere glycolyse flux zal resulteren in een verhoogde lactaat productie wat Daarnaast biedt deze techniek de mogelijkheid om op hetzelfde moment de concentraties van belangrijke regulerende metabolieten (ADP, Pi) nauwkeurig te bepalen. Na de door elektrische stimulatie geïnduceerde inspanning is het mogelijk de snelheid van herstel te meten (PCr recovery). Deze PCr recovery meting is een maat voor de mitochondriële functie en wordt veelvuldig gebruikt om mitochondriële dysfunctie in type 2 diabetes te kwantificeren.

Daarnaast is het mogelijk om tijdens de MRS metingen

Naast de niet invasieve MRS en is het voor een goede interpretatie van de experimentele data noodzakelijk om spiersamples te collecteren. Deze samples zullen worden gebruikt om te analyseren hoeveel glycogeen er verbruikt is tijdens de contracties; de concentratie van glycolyse enzymen, *in vitro* markers van mitochondriële functie, lactaat transporters (MCT 1 en 4) en de vascularisatie van het spierweefsel te bepalen. Deze complementaire informatie zal gebruikt

worden om te bepalen of er tijdens de stimulatie een verschil is geweest in het glycogeenverbruik. Het is namelijk mogelijk dat een verschil in glycolyse flux aanwezig is, blijft door een verhoogde lactaat transport capaciteit. Om dit uit te sluiten is het noodzakelijk zowel het glycogeenverbruik als de concentratie van lactaat transporters te bepalen. Daarnaast zal deze informatie gebruikt worden om de oorzaak van een eventueel verschil in glycolyse flux of spiervermoeidheid op grond van cellulaire fenotype te verklaren.

6. Wetenschappelijke beoordeling

De onderzoekslijn wordt gefinancierd uit het VIDI-project

. Het project is door de principal investigator op zijn wetenschappelijke en maatschappelijke merities beoordeeld en akkoord bevonden.

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species en gewenste stam: ZDF *fa/fa* ratten.

De ZDF *fa/fa* rat is uitermate geschikt als model voor type 2 diabetes. De *fa* mutatie zorgt voor een verkorting van de leptine receptor dat leidt tot insuline resistentie. *fa/fa* ZDF ratten worden obees en ontwikkelen hyperlipidemie en hyperglycemie. Daarnaast hebben wij aangetoond dat de *fa/fa* ten opzichte van de controle (*fa/+*) 30% verminderde mitochondriële capaciteit heeft. De leeftijd van de ratten ten tijde van het begin van de studie zal 11 weken zijn. Bij een leeftijd van 12 weken zijn de ratten diabeet. De ratten worden gemeten op een leeftijd van 14 weken.

Herkomst: De dieren worden geleverd door het bedrijf Charles River.

Uiteindelijke bestemming: Na de experimenten zullen de dieren worden opgeofferd waarna skeletspieren worden gebruikt voor bepaling van glycogeen concentratie, concentratie glycolyse enzymen, markers van mitochondriële functie, lactaat transporters en vascularisatie.

7b. Sexe

Er is gekozen om enkel mannelijke dieren te gebruiken. Het ontstaan en verloop van type 2 diabetes in de ZDF *fa/fa* is niet voor beide geslachten hetzelfde. De ontwikkeling van type 2 diabetes is het snelst en het best voorspelbaar in de mannelijke ZDF *fa/fa*. Daarom kiezen we ervoor om de steekproeven te beperken tot 1 geslacht, namelijk mannelijk.

7c. Aantallen

We willen dit experiment uitvoeren voor 2 verschillende niveau's van spierexcitatie. Hiermee willen we bepalen of een eventueel wel of niet gevonden effect op glycolyse flux of spiervermoeidheid afhankelijk is van het inspanningsniveau.

Inspanningsniveau 1: tetanische contractie

Inspanningsniveau 2: single twitch

Tijdens stimulatie wordt een deel van de glycogeen voorraad opgebruikt. Kwantificering van de hoeveelheid verbruikt glycogeen is noodzakelijk voor betrouwbare interpretatie van de data (zie sectie wetenschappelijke onderbouwing). Om dit mogelijk te maken is het noodzakelijk zo snel mogelijk na stimulatie de Tibialis Anterior uit de rat te verwijderen (dit om glycogeen re-synthese te voorkomen). Om onnodig ongerief te voorkomen zal de rat alvorens de Tibialis Anterior gecollecteerd wordt, eerst opgeofferd worden. Dit betekent ook dat er maar 1 experiment per dier uitgevoerd kan worden. De Tibialis Anterior uit de poot die niet gestimuleerd is, zal echter gebruikt worden voor bepaling van de basale glycogeen concentratie in rust.

Powerberekening:

Van de verschillende technieken die worden toegepast is in dit geval de bepaling van de glycolyse flux op basis van de pH dynamica het minst gevoelige. Het verschil in mitochondriële capaciteit tussen de *fa/fa* en *fa/+* is 30% (DEC 2009 -123). Op basis hiervan verwachten we dat de glycolyse flux 30% zal toenemen om de verminderde mitochondriële capaciteit te compenseren $\rightarrow \delta = 30\%$. De onnauwkeurigheid van het schatten van de glycolyse flux op basis van pH dynamica was in een soortgelijke studie ongeveer 20% (DEC 2010 - 005)

Om een effect δ van 30% te kunnen aantonen bij een power π van 80% is het aantal volgens de formule van L. Sachs $n = 15.7 * (20/30)^2 = 6.98$

De uitval in de vorige qua meetmethodes betreft gelijksoortige studie was laag, namelijk 7%.

Steekproefgrootte $n = 6.98 / 0.93 = 7.50 = 8$ dieren per groep

Aantal dieren per experimentgroep

	Inspanningsniveau 1	Inspanningsniveau 2
ZDF <i>fa/+</i>	8	8
ZDF <i>fa/fa</i>	8	8

Totaal aantal dieren: 32

8 Dierproef

8. Experiment

De glycolyse en mitochondriële flux en metaboliet concentraties wordt in Wistar ratten gemeten met behulp van ^{31}P MRS. 1 week na aankomst in het dierverblijf op de TU/e worden bij de dieren de metingen uitgevoerd (SOP2).

Voor de MRS scanner sessie wordt het dier onder anesthesie gebracht (inductiekamer met isofluraan / medische lucht mengsel). De rat wordt in de ^{31}P opstelling geplaatst met de Tibialis Anterior ter hoogte van de ^{31}P RF-spoel. Door middel van kleine incisies in de huid worden de elektrodes subcutaan op de poot geplaatst en aangesloten op de stimulator (SOP 1). Deze methode is weinig invasief, waardoor het ongerief, hierdoor veroorzaakt, minimaal is. Gedurende de MRS meting wordt de kracht geleverd door de Tibialis Anterior non invasief gemeten door een eigen . Een typische MRS meting duurt vanaf het onder anesthesie brengen van de rat tot aan het beëindigen van de meting aan de tweede poot ongeveer 1 – 1.5 uur.

Na een meting de MRS meting wordt het dier, nog steeds onder anesthesie, opgeofferd d.m.v. het verbloeden van de vena cava caudalis (SOP3). Hierna wordt de Tibialis Anterior van beide poten gecollecteerd voor verdere *in vitro* analyses.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Aanbrengen elektrode: De ratten worden verdoofd via ademhalingsanesthesie: de rat wordt in plexiglas inductiekamer geplaatst waarin het mengsel van medische lucht (0.60 L/min) en isofluraan wordt aangevoerd. Na de inleiding (3.5 vol% isofluraan) wordt de rat in de opstelling gelegd en gebeurt het onderhouden van dezelfde anesthesie via een ademhalingskapje (begin proef 2 vol% isofluraan, einde experiment 1-1.5 vol%).

MR meting: Hiervoor wordt dezelfde ‘onderhoudsmethode’ gebruikt als voor het aanbrengen van de elektrode plaatsvindt. Opoffering wordt toegepast d.m.v. het verbloeden via de vena cava caudalis onder anesthesie.

9b. Pijnbestrijding

Voor de MRS meeting is het niet nodig additionele pijnbestrijding te gebruiken, omdat deze methode al reeds eerder gebruikt is en bekend is dat pijnbestrijding niet noodzakelijk is. Echter voor het opofferen d.m.v. verbloeden van de vena cava caudalis is additionele pijnbestrijding wel noodzakelijk. Om ervoor te zorgen dat het opofferen zo snel mogelijk kan plaatsvinden nadat het dier uit de MRI scanner komt (om zo glycogeen re-synthese te voorkomen) zal de pijnbestrijding voor het begin van het MRS experiment al worden toegediend.

Voor de start van het experiment zal Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie worden toegediend.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Het opofferen van de dieren gebeurt met onder volledige anesthesie en analgie dmv het verbloeden via de vena cava caudalis (SOP 3).
- Mocht er een duidelijke veranderingen in gedrag, gang/mobiliteit, verzorgingstoestand, voedingstoestand of andere in het oog springende afwijkingen zijn, wordt in overleg met de artikel 12 besloten of euthanasie noodzakelijk is. Voorbeelden van specifieke duidelijke gedragveranderingen zijn bijvoorbeeld lusteloos gedrag slechte verzorging van de vacht/ogen. Wanneer dit geconstateerd wordt zal de rat onder striktere controle komen te staan. Zolang de

rat normaal blijft eten en drinken (gecontroleerd ahv gewicht/wegen voer en glans van de vacht) zal de rat in experiment blijven. Wanneer een rat zijn gehele eetlust heeft verloren wordt de rat uit experiment gehaald, omdat dit tevens een belangrijke invloed heeft op de spieren en dus de resultaten.

10a. Ongerief

Het betreft hier een terminaal experiment dat geheel onder anesthesie wordt uitgevoerd. Het ongerief als gevolg van het implanteren/verwijderen van de elektrode wordt geschat op 02. De MRS scannersessies worden als gering/matig ongerief geschat, op basis van eerder door ons uitgevoerde studies.

Ongerief: 02

10b. Welzijnsevaluatie

De metingen komen gedeeltelijk overeen met eerdere studies (DEC protocol nummer 2005-108, 2008-018, 2009-123, 2010-005). Het effect van deze metingen staan hierboven beschreven en komen erop neer dat de ratten weinig ongerief ondervinden van het implanteren/verwijderen van de elektrode en de MRS studie. Er zal een welzijnsdagboek worden bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

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

12. Deskundigheid

De proef zal uitgevoerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker, in het bezit van WOD art 9. Hulp en assistentie krijgt hij van de vervangend onderzoekers (WOD art 9) en ervaren biotechnici (WOD art 12). De MRS metingen zijn gedeeltelijk gelijk aan eerder uitgevoerde studie (DEC 2009-123, DEC 2010-005). De metingen zijn door de verantwoordelijk onderzoeker en medewerkers CPV meerdere malen uitgevoerd en zijn probleemloos verlopen.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage

Relevante literatuur

1. Lowell BB, Shulman GI, (2005) *Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes*, Science 21;307(5708):384-7
2. Wagenmakers AJ, (2005) *Insulin resistance in the offspring of parents with type 2 diabetes*, PLoS Med. 2(9):e289
3. Phielix E, Mensink M, (2008) *Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function*, Physiol Behav. 23;94(2):252-8.
4. Ohlendieck K., (2010) *Proteomics of skeletal muscle glycolysis*, Biochim Biophys Acta.1804(11):2089-101
5. Shulman GI, Rothman D, Jue T, Stein P, DeFronzo R, Shulman R, (1990), *Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy*, N Engl J Med 322:223-228
6. Kelley DE, Mandarino LJ, (2000) *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*, Diabetes. 49(5):677-83.
7. Roman BB, Meyer RA, Wiseman RW, (2002) *Phosphocreatine kinetics at the onset of*

contractions in skeletal muscle of MM creatine kinase knockout mice, Am J Physiol
Cell Physiol. 283(6):C1776-83

Bijlage 1

SOP1: aanbrengen subcutane elektrostimulatie-elektrode

- Algehele anesthesie met behulp van isofluraan op medische lucht (0.60 L/min) De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van het ooglid- en tussenteenreflex.
- Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de rat gepositioneerd wordt.
- De ogen worden bevochtigd met oogzalf
- De operatie wordt a-septisch uitgevoerd, alle benodigde instrumenten worden vooraf ge-autoclaveerd, net als de te implanteren elektrode.
- Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie voor pijnbestrijding
- De vacht in het laterale deel van de achterpoot wordt geschoren. De huid wordt geschoren, gewassen en ontsmet met jodium tinctuur.
- Bij de 2 incisies wordt een “skin pocket” gemaakt dmv stomp prepareren.
- Beide polen van de elektrode worden elk in een skin pocket gebracht.
- Met 1-5 contracties wordt de werking van de elektrode getest: onbelast moet de voet krachtig naar het onderbeen toe bewegen.
- Wanneer de stimulatie kwalitatief goed is worden beide elektrodepolen vastgezet met 1 hechting.
- Na het beëindigen van het experiment waarvoor de elektrostimulatie nodig was worden de elektrodepolen verwijderd en beide incisies in de huid gehecht.

SOP 2: NMR meting in vivo in rat

- De rat wordt gewogen.
- De rat wordt in een plexiglas inductiekamer geplaatst die aangesloten wordt op de anesthesie aanvoerleiding. Dragergas: medische lucht (0.6 L/min): anesthesie: iso-fluraan
- Wanneer de rat voldoende onder anesthesie is, wordt het dier in de NMR-opstelling gelegd, op z'n rug, met het bovenlichaam op de verwarmde houder. De anesthesie wordt vanaf nu verstrekt via een ademhalingskapje. De elektrode wordt aangesloten op de stimulator.
- De sensors voor het monitoren van de fysiologische parameters worden aangebracht: een ballonnetje voor het meten van de ademhaling wordt op of onder de thorax geplaatst en de rectale thermometer wordt met behulp van glijmiddel ingebracht.
- De ogen worden bevochtigd met oogzalf.
- De dosering van de anesthesie tijdens de meting wordt gebaseerd op de ademhalingssnelheid: de duur tussen 2 ademhalingscycli wordt tussen 800 en 1200 ms gehouden.
- De rat wordt op zo'n manier gepositioneerd dat het te meten lichaamsdeel goed is gepositioneerd t.o.v. van de RF-spoel. Hierbij wordt de rat zacht gefixeerd met behulp van stukjes schuim.
- Tijdens de ^{31}P MRS metingen wordt de Tibialis Anterior
Het contractieprotocol
bestaat uit maximaal 5 minuten, contractie, gevolgd door 10 minuten herstel.
- Na de NMR sessie wordt de rat uit de scanner gehaald.
- De hechtinkjes over de elektrodes worden voorzichtig los geknipt en de elektrodes worden verwijderd.
- De incisies worden door middel van 1 of wanneer nodig 2 hechtingen gedicht (zie SOP 1).

SOP 3: Opoffering onder anesthesie

- Rat onder IsoFlo-narcose (kapje)
- Testen oog- teenreflex
- Buik en Thorax ruim scheren
- (Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie voor pijnbestrijding 15 min pre-op.)
- Buik en Thorax ruim scheren
- Minimale huidincisie
- Huid zijdelings vrij prepareren
- Buik openen zodat diafragma zichtbaar is
- Ingewanden opzij leggen en *vena cava caudalis* aanprikken



Aan:

Ons kenmerk : Doorkiesnummer Maastricht
043 31-05-2011

Project: *Heeft de verminderde mitochondriële capaciteit in Type 2 Diabetes een verhoogde ATP productie door glycolyse of een versnelde en verhoogde spiervermoeidheid tijdens inspanning tot gevolg?*

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-073
Diersoort: rat
Aantal dieren: 32
Einddatum: 27-05-2015

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