Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011 - 102

Ontvangen: 20-07-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag [2]
20-07-2011	Nieuw

VROM/GGONR[3]

LNV/CBDNR[4]

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM TU/e
Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			**Lever-metabolisme**

Financieel beheerder		Budgetnummer	503220-10008903

Titel van het onderzoek:

Gelokaliseerde ^{1}H-[^{13}C] MRS detectie van ^{13}C-gelabelde vetten in de steatotische lever

startdatum 01/08/11 einddatum [9] 01/08/15 *Duur van de proef [10]:* *11 weken*

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid[5]	Cap. groep /afdeling
1.Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO[7]					
4. overige uitvoerenden				Art.12	
5. Principle Investigator				-	

Diergroep	1	2	.	.	.	.	.
ctrl/exp/sham	Exp	Exp					
Diersoort	02	02					
Stam	Wistar	Wistar					
Construct / mutatie ?	nee	nee					
Herkomst (leverancier) *	02	02					
Aantal	27	33					
Geslacht	man	man					
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja	ja/nee[8]	ja/nee[8]	ja/nee[8]	ja/nee[8]	ja/nee[8]
Leeftijd/gewicht	11 weken	11 weken					
Doel van de proef *	33	33					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	03	02					
Toestand dier einde exp*	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: Gelokaliseerde ^{1}H-[^{13}C] MRS detectie van ^{13}C-gelabelde vetten in de steatotische lever

1. Doel van de proef.

Deze studie situeert zich in het onderzoek naar levermetabolisme in type 2 diabetes.
Het doel van dit onderzoek is om te bepalen of er een verschil is in het vetmetabolisme in een vette, insulineresistente lever en een vette, niet-insulineresistente lever. Hiervoor zullen verschillende methoden gebruikt worden. Om de vetzuuropname in de lever *in vivo* te bepalen zal gebruik gemaakt worden van de eerder gebruikte methode (gelokaliseerde ^{1}H-[^{13}C] MRS)(DEC 2008-024 en 2009-117) met ^{13}C-gelabeld vet als substraat. Met behulp van deze methode zal ook de totale lipide concentratie in de lever bepaald worden.
Er zal eveneens een bepaling plaatsvinden van de export van triglyceriden (VLDL secretie) uit de lever alsook een ipGTT (intraperitoneale glucose tolerantie test) om de insuline gevoeligheid te bepalen, zowel op lever als heel lichaamsniveau.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Anno 2010 hadden ruim 810.000 Nederlanders diabetes en dit aantal neemt jaarlijks toe met 71.000. Hiervan hebben ongeveer 700.000 mensen (80-95%) type 2 diabetes. Een vroeg kenmerk van type 2 diabetes is insulineresistentie. Hierbij reageert het lichaam minder goed op insuline.
Type 2 diabetes ontstaat meestal op oudere leeftijd maar de laatste tijd worden steeds meer mensen jonger dan 30 gediagnosticeerd. Dit kan het gevolg zijn van het toenemend aantal mensen met overgewicht en een slecht voedingspatroon. Insuline resistentie, dat een kenmerk is van type 2 diabetes, geeft een verandering in de balans tussen deze influx of synthese van levervetten en hun export of oxidatie dat leidt tot het ophopen van vet in de levercellen. Dit noemt men steatose, leververvetting of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Leversteatose komt meer voor bij mensen met diabetes (50%) en obesitas (76%). Ongeveer 50% van de Nederlandse bevolking heeft overgewicht (BMI > 25) en ongeveer 12% heeft obesitas (BMI > 30). Van hen heeft ongeveer 60 tot 75% leversteatose. Dit is een omkeerbaar proces, dus de vetstapeling verdwijnt zodra de oorzaak wordt weggenomen. Wanneer de oorzaak niet wordt weggenomen, breidt de vetstapeling zich uit en kan een ontsteking van de lever ontstaan: Niet Alcoholische Lever Hepatitis (NASH). NASH kan uiteindelijk ontaarden in levercirrose.

3. Alternatieven

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

4. Ethische afweging

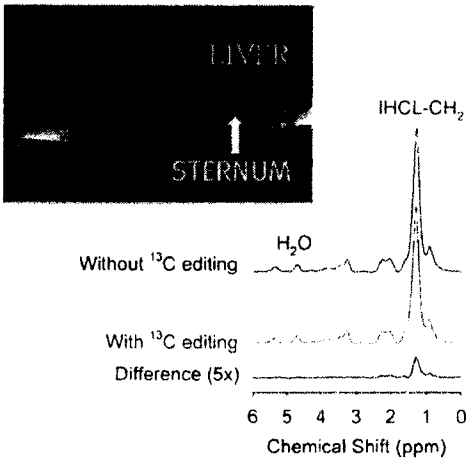
Doordat ^{1}H-[^{13}C] MRS een niet-invasieve methode is, geeft de meting weinig ongerief. Ook de bepaling van de VLDL secretie en de ipGTT geven relatief weinig ongerief. Dit in combinatie met de verwachting dat dit onderzoek bijdraagt aan het vinden van de oorzaak of mogelijk behandeling van type 2 diabetes en leversteatose, vindt de VO de experimenten ethisch verantwoord.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Een veranderende levensstijl en voedingspatroon zorgen ervoor dat meer en meer mensen lijden aan het metabool syndroom wat een verzameling is van risicofactoren die de kans vergroten op type 2 diabetes en cardiovasculaire aandoeningen. Deze zijn centrale zwaarlijvigheid, verhoogde bloeddruk, insuline-resisentie, dyslipidemie en verstoorde glucose tolerantie [1]. Dit kan leiden tot type 2 diabetes, dat gekarakteriseerd wordt door insulineresistentie en leversteatose.

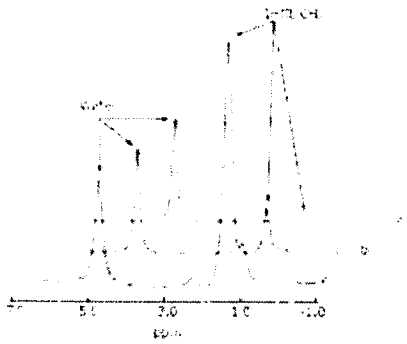
De vraag die we met dit onderzoek willen beantwoorden is of er een verschil is in vetmetabolisme tussen een vette, insulineresistente lever en een vette, niet-insulineresistente lever.
Hoog-vet diëten worden gebruikt om de ontwikkeling van insulineresisentie en zwaarlijvigheid in diermodellen te bestuderen. Verschillende hoog-vet diëten induceren verschillende effecten waarbij vooral het effect van de gesatureerde long-chain fatty acids (LCFA) in deze studie zal onderzocht worden. Er zullen twee hoog-vet diëten gebruikt worden: één dat vooral bestaat uit palmolie (voornamelijk bestaande uit gesatureerde C16 ketens) en één dat vooral bestaat uit lard (voornamelijk bestaande uit gesatureerde C18 ketens) [2]. De reden waarom we de twee hoog-vet diëten met elkaar willen vergelijken is omdat de mate waarin de vetzuren geoxideerd worden afhankelijk is van de ketenlengte en de mate van saturatie. De oxidatie-efficiëntie van vetzuren neemt af met toenemende ketenlengte, dus C16:0 wordt efficiënter geoxideerd dan C18:0 [3]. Ook is aangetoond dat LCFA een negatief effect hebben op de insuline gevoeligheid en een toename in de hoeveelheid vet in de lever [4]. Met dit onderzoek willen we kijken of het verschil in ketenlengte een invloed heeft op het vetmetabolisme, de insulinegevoeligheid (lever en volledig lichaam) en de mate van leververvetting.

In het voorgestelde onderzoek zal de dynamiek van de IHCL pool over de tijd gevolgd worden na de orale toediening van ^{13}C gelabeld vet. Met behulp van ^{1}H-[^{13}C] MRS worden vervolgens de signalen van protonen gebonden aan ^{13}C specifiek waargenomen door gebruik te maken van verschilspectroscopie (POCE) [5-6]. Deze methode werd al met succes uitgevoerd in lever en spier (4, 24 en 48 uur na toediening) (DEC 2008-024 en 2009-117) na het oraal toedienen van ^{13}C gelabeld vet (figuur 1). In dit onderzoek zal het uitgevoerd worden 4 en 24 uur na orale toediening van het ^{13}C gelabeld vet.



Figuur 1: ^{1}H MR spectrum zonder en met ^{13}C editing van de lever. Het bovenste spectrum geeft de totale lipide pool weer, het middelste spectrum geeft de ongelabelde lipide pool weer en het onderste is het verschil van beide en geeft de ^{13}C-gelabelde lipide pool weer.

De totale hoeveelheid vet (IHCL) kan eveneens bepaald worden met bovenstaande methode. Hierbij kan dan een onderscheid gemaakt worden in de mate van leververvetting (figuur 2).



Figuur 2: Typische proton MR spectrum van de lever in personen met verschillende graden van vetinfiltratie. Spectrum a toont minimale vetinfiltratie, spectrum b toont een lever met gemiddelde vetinfiltratie en spectrum c een spectrum met hoge vetinfiltratie [7].

De triglyceriden die in de lever worden opgeslagen, verlaten de lever als VLDL. De overproductie van VLDL wordt geassocieerd met een aantal aandoeningen die een verhoogd risico geven op cardiovasculaire aandoeningen [8]. Door toedienen van een niet-ionisch detergent (Triton WR-1339) is het mogelijk om de afbraak van de triglyceriden te blokkeren. Na toedienen van het product wordt op verschillende tijdstippen bloed afgenomen waarin de triglyceride concentratie bepaald wordt. Hieruit kan dan de hepatische triglyceride productie snelheid (VLDL secretie) bepaald worden.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Het onderhavige project wordt gefinancierd vanuit de eerste geldstroom en het

'. Het hier voorgestelde onderzoek naar het meten van vetmetabolisme in de lever past binnen dit onderzoek. Dit specifieke onderzoek is gelezen en akkoord bevonden door de promotor en co-promotor van de VO en VVO, beide werkzaam in de an de TU/e.

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

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

7b. Sexe

In dit onderzoek zal gebruik gemaakt worden van mannelijke Wistar ratten. In deze studie wordt voor mannetjes gekozen omdat, daar deze beter voorspelbaar insuline resistent worden wanneer ze op een dieet gezet worden met een hoge calorische waarde.

7c. Aantallen

Groep 1 (MRS metingen):

Als uitgangspunt voor de power berekening wordt de ^{1}H MRS meting gebruikt. In een vorige rattenstudie bleek dat de spreiding van ^{13}C-verrijking ongeveer 0.5% is. Het beoogde effect wordt geschat op 0.7%. Voor een tweezijdige toets met α=0.05 en π=80% geldt: $n = 15.7 * (0.5/0.7)^2 = 8.01$

De uitval in het vorige soortgelijke onderzoek was uiterst gering. Er is 1 dier gestorven in 2 groepen van 6 dieren. Dit komt neer op 8.3%.

Steekproefgrootte = 8.01/0.92 = 8.71 dus 9 dieren per dieetgroep in groep 1. Dit geeft een totaal van 27 dieren voor groep 1.

groep	soort dieet	aantal dieren
1a	controle (C)	9
1b	hoog-vet (Lard)	9
1c	Hoog-vet (palmolie)	9
	TOTAAL:	27

Groep 2 (VLDL secretie + ipGTT):

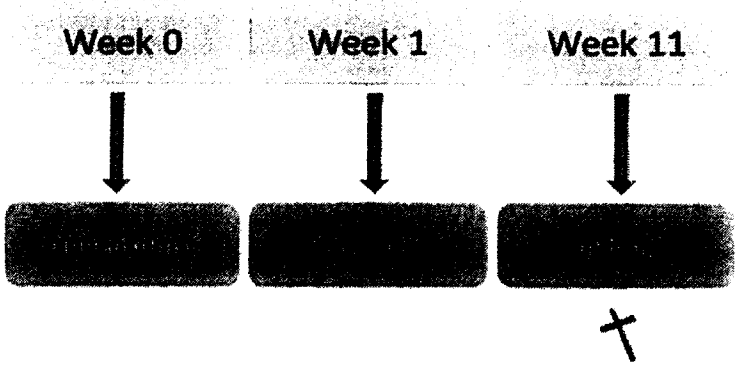
Voor groep 2 wordt de ipGTT als uitgangspunt gebruikt voor de powerberekening, omdat de VLDL bepaling nog niet eerder uitgevoerd is in onze groep. Uit eerdere ipGTT bepalingen uitgevoerd door een andere groep [3] werd een spreiding van 23 vastgesteld op de oppervlakte onder de glucose curve en het verschil tussen deze waarden tussen de 2 verschillende soorten hoog-vet dieet is 29. Voor een tweezijdige toets met α=0.05 en π=80% geldt: $n = 15.7 * (23/29)^2 = 9.88$

De uitval bij een ipGTT is heel gering en schatten we op 10%. Steekproefgrootte = 9.88/0.90 = 10.98 wat dus een totaal geeft van 11 dieren per dieetgroep. Groep 2 bevat dus in totaal 33 dieren.

groep	soort dieet	aantal dieren
2a	controle (C)	11
2b	hoog-vet (Lard)	11
2c	Hoog-vet (palmolie)	11
	TOTAAL:	33

8. Experiment

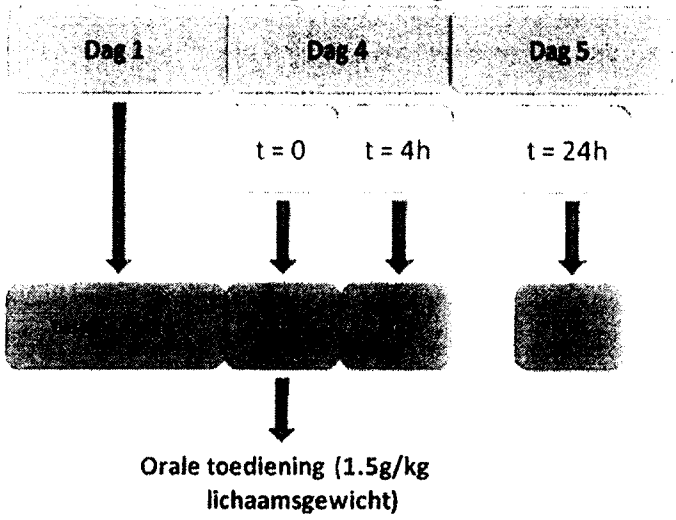
Voor de 2 groepen geldt het volgende schema:



De ratten komen binnen op een leeftijd van 11 weken (week 0) en acclimatiseren dan 1week. Op een leeftijd van 12 weken (week 1) wordt gestart met het dieet volgens de groep waarin ze ad random ingedeeld zijn. Het dieet wordt gedurende 10 weken gevolgd.

Groep 1:

Alle ratten van de eerste groep ondergaan dezelfde behandelingen en metingen (SOP1):



Op de eerste dag zal een baseline meting uitgevoerd worden zonder toediening van het substraat. Op de vierde dag wordt het substraat oraal toegediend en zal 4h later het dier onder anesthesie gebracht worden waarna een MRS meting uitgevoerd wordt, na afloop van de MRS meting zal het dier uit de anesthesie komen in de recovery. Op dag 5 (dus 24h na de toediening van het substraat) zal een laatste MRS meting uitgevoerd worden. Tijdens alle metingen zullen de dieren gemonitord worden. Voor en na elke meting zal ook een bloedstaal afgenomen worden uit de *vena saphena* (SOP2). Na de laatste meting op dag 5 wordt de rat onder anesthesie gehouden en wordt dan aansluitend geeuthanaseerd met een anesthesie inductie van 3 – 4% en premedicatie met buprenorfine (SOP3), waarna de lever zal gebruikt worden voor verder onderzoek.

Groep 2:

Alle ratten uit groep 2 zullen dezelfde behandelingen en metingen ondergaan. De ipGTT en VLDL secretie bepaling zullen elk 1 maal uitgevoerd worden (na 11 weken dieet) in dezelfde ratten met minimaal 1 dag en maximaal 4 dagen tussen de ipGTT en de VLDL secretie bepaling.

- ipGTT (SOP 4):

  Na overnacht vasten wordt eerst bloed afgenomen uit de *vena saphena*. Dan wordt een glucoseoplossing (50% [6,6-D2]-glucose en 50% glucose) in een dosis van 1mg/g lichaamsgewicht met een concentratie van 50mg/ml glucose intraperitoneaal toegediend. Vervolgens wordt bloed afgenomen op 15, 30, 45, 60, 90 en 120 minuten na glucose toediening uit de *vena saphena*.

- VLDL bepaling (SOP 5):

  Eerst worden de dieren 4h gevast waarna de rat onder anesthesie wordt gebracht met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie 3-4%; onderhoud 1-2%). Vervolgens wordt bloed afgenomen uit de *vena saphena*. Nadien wordt 400mg/kg lichaamsgewicht Triton WR-1339 (10% oplossing in PBS) iv toegediend. Vervolgens zal bloed afgenomen worden op tijdstippen: 30, 60, 90, 120 en 150 uit de *vena saphena*.

Na de laatste bepaling zullen de dieren onder anesthesie gebracht worden en aansluitend geeuthanaseerd met een anesthesie inductie van 3 – 4% en premedicatie met buprenorfine (SOP3), waarna de lever zal gebruikt worden voor verder onderzoek.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Met ademhalingsanesthesie worden de ratten verdoofd: ze worden in een inductiekamer van plexiglas geplaatst die aangesloten wordt op de aanvoerleiding voor anesthesie. Dragergas: medische lucht (0,6 l/min) en eventueel O_2 anesthesie: iso-fluraan (Forene ®), voor de inductie 3-4% en daarna 1-2,5% als onderhoud. Het onderhoud van de anesthesie gebeurt met een mondkapje.

9b. Pijnbestrijding

Er zal pijnbestrijding (Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg) toegepast worden bij de dieren in groep 2 indien een hematoom duidelijk zichtbaar wordt op de te prikken poot.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie vindt plaats door verbloeden onder anesthesie (SOP 3).
Humaan eindpunt: wanneer er 15% of meer gewichtsverlies optreedt of het dier niet meer eet of drinkt, zal het geëuthanaseerd worden. Ander sterk afwijkend gedrag (zoals minder eten en drinken en de vacht niet meer onderhouden) kan ook een reden zijn om het dier te euthanaseren.

10a. Ongerief

groep 1 (MRS metingen):

interventie	frequency	ongerief
MRS meting	3 maal	2
Ontwaken uit anesthesie (isofluraan)	2 maal	3
afnemen bloed onder anesthesie	6 maal	2

Groep 2 (VLDL secretie en ipGTT):

interventie	frequency	ongerief
bloedafname *vena saphena* (ipGTT)	7 maal	2
bloedafname *vena saphena* (VLDL) onder anesthesie	6 maal	2
ip injectie	1 maal	2
Iv injectie onder anesthesie	1 maal	2

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere experimenten is gebleken dat de orale toediening van het substraat niet erg belastend is voor de dieren, net als de MRS metingen. De gebruikte anesthesiemethode zorgt zelfs na lange metingen voor het snel ontwaken van de dieren (binnen 10 minuten).

11. Verzorging en huisvesting

De ratten worden gehuisvest in de proefdiervoorziening van de TU Eindhoven. Alle beschreven experimenten worden in ! uitgevoerd. De dieren zullen met 2 of 3 in een kooi zitten met kooiverrijking en krijgen voedsel en water ad libitum. Bij calamiteiten zal de artikel 12 en eventueel 14 gewaarschuwd worden. De dieren uit de verschillende groepen krijgen een verschillend dieet.

12. Deskundigheid

De proef zal uitgevoerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker, in het bezit van zijn WOD art. 9. Hulp en assistentie krijgt hij van ervaren biotechnici, in het bezit van WOD art 12. De MRS metingen zijn gedeeltelijk gelijk aan eerder uitgevoerde studies (OE nr 2009-117 en 2008-024). Deze metingen zijn door dezelfde onderzoeker en medewerkers CPV uitgevoerd en zijn probleemloos verlopen.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijgevoegde documenten

Relevante literatuur

1. Panchal, S.K. and L. Brown, *Rodent models for metabolic syndrome research.* J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 351982.
2. Nkondjock, A., et al., *Specific fatty acid intake and the risk of pancreatic cancer in Canada.* Br J Cancer, 2005. **92**(5): p. 971-7.
3. van den Berg, S.A., et al., *High levels of dietary stearate promote adiposity and deteriorate hepatic insulin sensitivity.* Nutr Metab (Lond), 2010. **7**: p. 24.
4. De Vogel-van den Bosch, J., et al., *High-fat diets rich in medium- versus long-chain fatty acids induce distinct patterns of tissue specific insulin resistance.* J Nutr Biochem, 2010.
5. Henry, P.G., et al., *Proton-observed carbon-edited NMR spectroscopy in strongly coupled second-order spin systems.* Magn Reson Med, 2006. **55**(2): p. 250-7.
6. Henry, P.G., et al., *Semiselective POCE NMR spectroscopy.* Magnetic Resonance in Medicine, 2000. **44**(3): p. 395-400.

7. Cox, I.J., et al., *Current and future applications of in vitro magnetic resonance spectroscopy in hepatobiliary disease.* World J Gastroenterol, 2006. **12**(30): p. 4773-83.

8. *Millar, J.S., et al.,* Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. *J Lipid Res, 2005. **46**(9): p. 2023-8.*

SOP 1: *In vivo* ^{1}H-[^{13}C] MRS met real-time ^{13}C-tracer meting in ratten lever

- Rat wordt gewogen
- Er wordt een bloedstaal afgenomen uit de *vena saphena* (SOP 2)
- De rat krijgt oraal 1.5 mg/g lichaamsgewicht Algal lipid mixture (een soort pasta) toegediend met een spatel. Daarna wordt de rat voor 2 uur terug in zijn kooi gezet.
- De rat wordt in de inductiekamer geplaatst dat verbonden wordt met de anesthesie-aanvoerleiding. Het dragergas is medische lucht (0,6 l/min) en eventueel O2 anesthesie: isofluraan (3-4% voor de inductie en nadien 1-2,5% voor onderhoud tijdens de meting)
- Het dier wordt in de meetopstelling gelegd. Het bovenlichaam wordt op de verwarmde houder geplaatst en de anesthesie en lucht worden nu toegediend via een mondkapje. Het volledige lichaam van de rat wordt verwarmd.
- Er worden verschillende sensoren aangebracht voor de monitoring: het ballonnetje voor de ademhaling wordt op of onder de thorax geplaatst, de rectale thermometer wordt ingebracht en een thermometer wordt tussen het dier en het warmhoudmatje gelegd.
- De ogen van de rat worden bevochtigd met oogzalf
- De rat wordt zo gepositioneerd dat de lever bovenaan ligt, zo dicht mogelijk en in het midden van de spoel.
- De volledige opstelling wordt in de scanner geplaatst
- De anesthesie wordt tijdens de metingen bijgestuurd naargelang de ademhalingssnelheid
- De meting wordt gestart.
- Op het einde van de meting wordt de rat ofwel geëuthanaseerd ofwel bijgebracht in recovery bij 30°C, afhankelijk van het protocol.

SOP 2: Bloedafname via de *vena saphena*

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

Benodigdheden:
- rat – naald (blauw): 0.5 mm x 25 mm, 23 G)
- Washandje om het dier in the fixeren
- Gaasjes of tissues
- Warmtebron: infrarode lamp (150 Watt)
- Scheerapparaat
- K-EDTA Cupjes

Voorbereiding:
- Het dier indien nodig verwarmen m.b.v. een waterlamp, om de *vena saphena* goed zichtbaar te maken. Gedurende het opwarmen bij het dier blijven.
    - Warmtelamp: minimale afstand tot het dier 50 cm
    - Duur: minimaal 5 tot maximaal 15 minuten.
- De linker of rechter achterpoot wordt geschoren ter hoogte van de hak aan de laterale zijde.
- Het dier wordt gefixeerd door het tot het bekken in een speciaal daarvoor gemaakte dubbelgestikte washand (CPV) te laten lopen
- Het dier wordt vervolgens met de volle hand over de rug stevig rond het bekken vast gepakt.
- De rechter of linker achterpoot wordt gefixeerd tussen duim en wijsvinger zodat de poot gestrekt wordt.
- De poot wordt gestuwd door meer of minder druk op de binnenzijde van het bovenbeen (liesgebied) uit te oefenen.

Bloedafname:
- Zodra de vene goed zichtbaar is, wordt deze aangeprikt in het midden van het vat loodrecht op de huid.
- Door meer of minder te stuwen kan de uitstromende hoeveelheid beïnvloedt worden.
- Het bloed wordt opgevangen in een cupje.
- Per dier wordt een nieuwe naald gebruikt.

Nazorg:
- Tijdens en na afloop van de bloedafname wordt gecontroleerd of het dier ongewenste effecten van de handeling ondervindt.
- Na de bloedafname wordt gedurende enkele seconden de aanprikplek met een gaasje dichtgedrukt. Om het bloeden te verminderen kan ook de voet geflext worden.

SOP 3: Opoffering onder anesthesie door middel van verbloeden

- Rat onder IsoFlo-narcose (kapje)
- Testen oog- teenreflex
- Buprenorphine Temgesic 0.1 mg/kg injectie voor pijnbestrijding
- Buik en Thorax ruim scheren
- Minimale huidincisie
- Huid zijdelings vrij prepareren
- Buik openen zodat diafragma zichtbaar is
- Met spits schaartje klein gaatje in diafragma maken onder *xyphoïd*
- Ingewanden opzij leggen en *vena cava caudalis* aanprikken
- Bloed aspireren met een spuit

SOP 4: ipGTT

- De dieren worden overnacht gevast
- De ipGTT begint 's morgens op een vast tijdstip
- Rat wordt gewogen
- Er wordt een bloedstaal afgenomen uit de *vena saphena* (SOP 2)
- De rat krijgt een 1 g/kg lichaamsgewicht glucose oplossing (50 mg/ml, 50 % [6,6-D2] glucose en 50 % glucose in water) intraperitoneaal toegediend.
- De rat wordt terug in zijn kooi gezet waarna op de tijdstippen 15, 30, 45, 60, 90 en 120 min een bloedstaal wordt afgenomen uit de *vena saphena* volgens SOP 2.

SOP 5: VLDL bepaling

- De dieren worden 4u gevast
- Rat wordt gewogen
- Rat wordt onder anesthesie gebracht met behulp van inhalatie anesthesie met isofluraan (inductie 3-4 %; onderhoud 1-2 %). Het anestheticum wordt toegediend via een mondkapje met behulp van medische lucht als dragergas. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex.
- Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat, waarop de rat gepositioneerd wordt, onder voortdurende bewaking van de ademhalingsfrequentie.
- Er wordt bloedafgenomen uit de *vena saphena.*
- Er wordt 400 mg/kg lichaamsgewicht Triton WR-1339 (10% oplossing in PBS) iv toegediend in de staartvene.
- Op de tijdstippen 30, 60, 90, 120 en 150 min zal een bloedstaal wordt afgenomen uit de *vena saphena.*

University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

Aan: TUE/

Postbus 513
5600 MB Eindhoven

voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-

Uw referentie: Onze referentie : Maastricht, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Gelokaliseerde ^{1}H-[^{13}C] MRS detectie van ^{13}C-gelabelde vetten in de steatotische lever*", is op de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 7c de uitval als percentage te vermelden.
- De DEC wijst er op bij punt 7c dat bij de berekening van de aantallen "F 15.7" is en niet "15.07".
- De DEC wijst erop bij punt 9a dat inductie dient te gebeuren met 3-4% isofluraan. Gaarne in het gehele protocol aanpassen.
- Bij punt 9c verzoekt de DEC het "sterk afwijkend gedrag" specifieker te beschrijven.

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 2011-102, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Technische Universiteit
Eindhoven
University of Technology

NL a2.60, Postbus 513, 5600 MB Eindhoven

voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: 043

Postbus 513, 5600 MB Eindhoven

Onderwerp
Aanpassing 2011 - 071

Datum
31 mei 2011

Contact

Uw kenmerk

Geachte

Naar aanleiding van de vragen/opmerking die de DEC had aangaande project 2011 – 102, kan ik daarop de volgende antwoorden geven:

1. De DEC verzoekt bij punt 7c de uitval als percentage te vermelden.
2. De DEC wijst er op bij punt 7c dat bij de berekening van de aantallen "F 15.7" is en niet "15.07".
3. De DEC wijst erop bij punt 9a dat inductie dient te gebeuren met 3-4% isofluraan. Gaarne in het gehele protocol aanpassen.
4. Bij punt 9c verzoekt de DEC het "sterk afwijkend gedrag" specifieker te beschrijven.

Voor punt 1 is de uitval aangegeven als zijnde 10% en bij punt 2 is de F aangepast en zijn de aantallen opnieuw berekend. Punt 3 is in het hele protocol aangepast en het sterk afwijkend gedrag (punt 4) is omschreven als minder eten en drinken en het niet meer onderhouden van de vacht.

Alle aanpassingen zijn grijs gemarkeerd in de aanvraag.

Met vriendelijke groet,

Maastricht University

Faculty of Health, Medicine and Life Sciences

Aan: TUE

Postbus 513
5600 MB Eindhoven

Ons kenmerk	*Doorkiesnummer*	*Maastricht*
	043-	22-07-2011

Project: *Gelokaliseerde ^{1}H-[^{13}C] MRS detectie van ^{13}C-gelabelde vetten in de steatotische lever.*

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, 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**.

Projectnummer:	**2011-102**
Diersoort:	**rat**
Aantal dieren:	**60**
Einddatum:	**20-07-2015**

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

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM
T (043)

Bezoekadres

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht