

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie nov. 2005

Herziene versie

DECNR: 2011-074

Ontvangen: 28-06-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
01-07-2011	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.			Skeletspier metabolisme
-------------	----------	-------------	----------	----------	--	--	-------------------------

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

Budgetnummer	503210-10009577
--------------	-----------------

Titel van het onderzoek:

Regulatie van aerobe versus anaerobe ATP productie in skeletspier

startdatum 01-juni-2011 einddatum 9 01-sept-2013 Duur van de proef¹⁰: 1 dag

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. Principal investigator			Art.9	

Diergroep	1	2					
ctrl/exp/sham	exp	exp					
Diersoort	02	02					
Stam	Wistar	Wistar					
Construct / mutatie ?	nee	nee					
Herkomst (leverancier) *	02	02					
Aantal	1	24					
Geslacht	man	man					
Dieren immuuncompetent ?	Ja	Ja					
Leeftijd/gewicht	15wk	15wk					
Doel van de proef *	37	37					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	01	01					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	04	04					
Mate ongerief *	02	02					
Toestand dier einde exp*	01	01					

2 Verantwoording

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

Titel: Regulatie van aerobe versus anaerobe ATP productie in skeletspier.

1. Doel van de proef.

De energiehuishouding van de skeletspier wordt steeds vaker gecorreleerd aan ziektebeelden (1). Binnen deze energiehuishouding vervullen het glycolyse en mitochondriële pathways een centrale rol. Om deze ziektebeelden beter te begrijpen is kennis van de mechanismen die de energiehuishouding reguleren van fundamenteel belang. Om meer inzicht te krijgen in deze regulerende processen wordt binnen de gezamenlijke onderzoekslijn

van de groeper van de faculteit
van de TU Eindhoven

De laatste jaren is er veel vooruitgang geboekt in de ontwikkeling van deze modellen. De regulatie mechanismen in het huidige model volstaan om het gedrag van mitochondria correct te reproduceren voor condities waarin geen glycolyse is (recovery na inspanning 6) en het gedrag van het glycolyse pathway wordt correct beschreven voor condities waarin er geen mitochondriële flux is (anaerobe condities 5). Een belangrijke vervolgstap in het onderzoek is om te testen of deze regulatie mechanismen ook volstaan om experimentele data te beschrijven voor condities waarbij er gelijktijdig glycolyse en mitochondriële flux is (inspanning tijdens aerobe condities), of dat hiervoor additionele regulatie mechanismen aan het model moeten worden toegevoegd.

Om deze test goed uit te voeren is kwantitatieve data over mitochondriële en glycolyse flux, concentraties van regulerende metabolieten (ADP, Pi) en het energieverbruik (kracht productie) voor verschillende contractie intensiteiten noodzakelijk. Op dit moment is zo een volledige dataset in de literatuur nog niet aanwezig.

In deze studie willen we door middel van *in vivo* nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectroscopy) de glycolytische en mitochondriële ATP productie, concentraties van regulerende metabolieten (ADP, Pi) en het energie verbruik (kracht productie) meten voor verschillende intensiteiten van spiercontractie.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Het betreft hier fundamenteel onderzoek aan de fysiologie van de skeletspier. De beoogde experimenten zullen bijdragen aan het testen en valideren van computationele modellen van skeletspier metabolisme. Deze modellen zullen, naar verwachting, mits gevalideerd op termijn sterk bijdragen aan Vermindering en Verfijning van experimenten in dieren. Op dit moment wordt het huidige model al ingezet voor de analyse van experimentele data door het gebruik van dierproeven waarbij het model het mogelijk maakt zonder extra experimenten meer inzichten te krijgen uit dezelfde hoeveelheid data / experimenten. Een goed voorbeeld van deze toepassing van het model is beschreven in een recente publicatie (7).

Verwacht wordt dat de computationele modellen op termijn zullen bijdragen aan een beter inzicht in de processen betrokken bij ziektebeelden die gecorreleerd zijn aan de energiehuishouding van skeletspier metabolisme, zoals de ontwikkeling van type II diabetes en veroudering. Dit heeft een hoge maatschappelijke relevantie gezien de vergrijzing en de grote toename in het aantal type II diabetes patiënten.

3. Alternatieven

De onderzoeksvraag vereist kwantitatieve informatie over mitochondriële en glycolyse flux.

concentraties van regulerende metaboliëten (ADP, Pi) en het energieverbruik (kracht productie) voor verschillende contractie intensiteiten. *In vitro* onderzoek aan skeletspieren is mogelijk (myotubes), echter er is gebleken dat deze resultaten op dit moment nog niet representatief zijn voor hoe het systeem zich *in vivo* gedraagt (2). Vandaar dat *in vivo* metingen voor dit onderzoek de voorkeur krijgen.

Een belangrijk regulatie mechanisme voor glycolyse flux is de calcium concentratie (2, 5). De calcium concentratie in een actieve spier heeft een pulsatieel karakter. De intensiteit van spiercontractie wordt bepaald door de frequentie van de calcium pulsen. Om de experimentele data kwantitatief te kunnen interpreteren en te gebruiken voor het testen van het computationeel model is het belangrijk dat de frequentie van de calcium pulsen bekend is. Dit betekent dat deze frequentie noodzakelijkerwijs van buitenaf opgelegd moet worden. Dit is in een rat mogelijk door het stimuleren van de motorzenuw met 2 (bipolaire) elektroden. In een humane studie is dit extern stimuleren van de motor zenuw veel lastiger uitvoerbaar. Daarnaast is voor deze studie zeer waardevol om na stimulatie spierbiopten te nemen om deze te analyseren op glycogeen verbruik. Voor het betrouwbaar bepalen van deze parameter 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.

Verder is door de combinatie van numerieke modellen met specifieke metingen in de spier is de reproduceerbaarheid van experimenten enorm toegenomen. Hierdoor is het benodigde aantal dieren laag.

4. Ethische afweging

De voorgestelde proef moet bijdragen aan een beter begrip van de belangrijke regulerende mechanismen in skeletspier metabolisme. Er is op dit moment een grote discussie over de rol van metabolisme in veroudering en de ontwikkeling van type II diabetes.

Wij verwachten door het verkrijgen van de nieuwe data als ook het gebruik van het computationeel model, we een nieuwe impuls kunnen geven aan dit onderzoeksveld en een belangrijke bijdrage leveren aan het begrip van de regulatie van energie metabolisme in spieren. Ook verwachten we dat wanneer het model is gevalideerd dit zal bijdragen aan het verminderen en verfijnen van dierproeven. De onderzoekers zijn 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 gezamenlijke

van de TU/e groepen van

beoogt een wiskundig multilevel kinetisch model van een skeletspier te ontwikkelen, waarmee fundamentele alsook toegepaste (met name type II diabetes) vragen over het functioneren van dit orgaan kunnen worden gesteld.

Wetenschappelijke onderbouwing onderzoeksvraag + hypothese

Voor een goed functionerende spiercel is het van vitaal belang dat energie productie en energie verbruik goed op elkaar zijn afgesteld. In spiercellen zijn er 2 processen verantwoordelijk voor het omzetten van chemische energie in nutriënten (glucose, vetzuren) in een energiebron (ATP) voor andere cellulaire processen zoals: spiercontractie, de synthese van eiwitten en lipiden. In de afgelopen decennia zijn er meerdere mechanismen geïdentificeerd die eventueel betrokken zijn bij deze afstelling (8). Er is op dit moment nog steeds grote discussie over welke van deze mechanismen een dominante rol hebben (zie bijv. (9)). Door de mechanismen te beschrijven in een computationeel model wordt het mogelijk om kwantitatief te testen in welke mate op basis van deze specifieke hypothesen / mechanismen het mogelijk is experimentele data op kwantitatieve wijze te verklaren. Door het toepassen van deze strategie hebben we geïdentificeerd dat voor mitochondriële ATP productie flux vooral regulatie door de concentratie van ADP en P_i dominant is (6) en voor glycolytische ATP productie de concentraties van ADP, P_i , glucose-6P en calcium (5). Deze regulatie mechanismen volstaan om het gedrag van mitochondria correct te reproduceren voor condities waarin geen glycolyse is (recovery na inspanning) en het gedrag van het glycolyse pathway wordt correct beschreven voor condities waarin er geen mitochondriële flux is (anaerobe condities). Wat op dit moment nog niet bekend is, is of regulatie mechanismen ook verantwoordelijk zijn voor de afstelling voor de verhouding tussen ATP productie flux van mitochondria en glycolyse. De hypothese die wij willen toetsen is of de regulerende mechanismen al aanwezig in het model (concentraties ADP, P_i , glucose-6P, calcium) deze afstelling kunnen verklaren. Een alternatieve hypothese is dat een proces genaamd 'redox shuttling' (transfer van NADH van cytoplasma naar de mitochondriële matrix en transport van NAD in de omgekeerde weg) ook een belangrijke bijdrage levert aan de regulatie (10). Mocht blijken dat het huidige model de nieuwe experimentele data niet kan beschrijven zullen we redox shuttling in het model opnemen en testen of dit proces inderdaad het ontbrekende mechanisme is.

Wetenschappelijke onderbouwing van benodigde experimenten

Om deze test goed uit te voeren is kwantitatieve data over mitochondriële en glycolyse flux en bijbehorende concentraties van regulerende metabolieten (ADP, P_i , glucose-6P) en het energieverbruik (kracht dynamica) voor verschillende contractie intensiteiten (calcium concentraties) noodzakelijk. *In vivo* ATP productie door glycolyse en de mitochondria en de ADP, P_i , glucose-6P concentraties kunnen gemeten worden met behulp van ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. Verschillend calcium concentraties kunnen worden opgelegd door het variëren van de stimulatiefrequentie. Als maat voor het energieverbruik kan de kracht dynamica (gemeten in de MRI scanner) worden gebruikt.

De glycolyse flux (lactaat productie) kan afgeleid worden uit de pH verandering in de spiercel. Echter zal een gedeelte van het lactaat tijdens en na de elektrische stimulatie van de spiercel naar het bloedplasma worden getransporteerd. Omdat dit transport ook de pH in de cel beïnvloed is het noodzakelijk dit proces in het computationeel model op te nemen. Om vast te stellen dat dit proces op een correcte manier gemodelleerd is, is het noodzakelijk om de dynamica van de lactaat concentratie in het bloed tijdens en na het experiment te bepalen. Daarnaast is het belangrijk om te bepalen hoeveel glycogeen (substraat van het pathway) is verbruikt en hoeveel lactaat (product van

het pathway) er na inspanning nog in de spier aanwezig is. Deze informatie zal gebruikt worden om de betrouwbaarheid van de model voorspellingen te toetsen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoelhouder, waarvan alle projecten door een externe wetenschappelijke commissie zijn beoordeeld.

Interne beoordeling is gedaan met een positief advies door de leerstoelhouder en de principal investigator.

6 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species en gewenste stam: Wistar rat

In deze studie zal gebruikt gemaakt worden van de Wistar rat. Gekozen is voor de Wistar rat omdat in voorgaand onderzoek in onze groep al meerdere relevante fysiologische parameters van de spier van deze rat bepaald zijn (DEC 2009-105 en DEC 2010-005). Deze informatie is gebruikt om de waarden van meerdere parameters in het model te bepalen. Door voor deze experimenten hetzelfde ras te kiezen kunnen we deze informatie en parameter waarden overnemen zonder dat er extra experimenten voor nodig zijn.

De leeftijd van de ratten ten tijde van het begin van de studie zal 15 weken zijn.

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 en lactaat concentratie, concentratie glycolyse en mitochondriële enzymen.

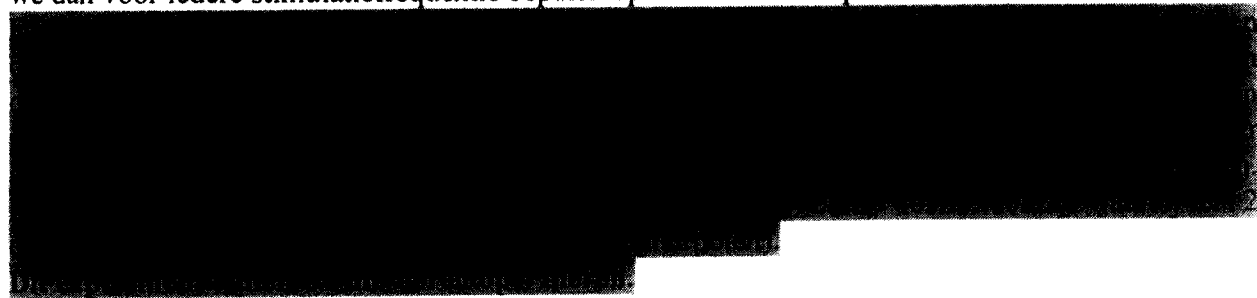
7b. Sexe

In deze studie worden mannelijke Wistar ratten gemeten omdat er geslacht gerelateerde verschillen zijn in het metabolisme en de spiervezelsamenstelling (11).

7.c. Aantallen

Experiment 1:

In het eerste pilot experiment willen we onderzoeken wat de optimale duur van het elektrisch stimulatie protocol is. Een belangrijke aanname in het model is dat het energieverbruik gelijk gedurende de contracties. Echter na een bepaalde periode zal door accumulatie van metaboliëten (ADP + Pi) en een daling in pH spiervermoeidheid optreden. Dit zorgt voor een afname van de krachtproductie en het energieverbruik. Om de experimentele data te gebruiken voor model analyse is het belangrijk dat op het moment dat spiervermoeidheid begint op te treden de contractie wordt gestopt en de spier aan de herstel periode kan beginnen. Op basis van experimenten onder anaerobe condities (DEC 2010-005) verwachten we dit moment bereikt wordt na +/- 3 minuten. Echter doordat nu wel zuurstof aanwezig is in de spier verwachten we dat dit moment van spiervermoeidheid nu later is waardoor het experiment langer kan duren en zo meer waardevolle data kan opleveren. In het pilot experiment willen we uitzoeken wat de optimale lengte van het elektrische stimulatie protocol is. Hiervoor willen we 2 experiment per stimulatiefrequentie (1Hz, 5Hz, 40Hz, 80Hz) uitvoeren waarbij we gedurende 10 minuten willen stimuleren. Achteraf kunnen we dan voor iedere stimulatiefrequentie bepalen op welk moment spiervermoeidheid intrad.



Experiment 2:

We willen de experimenten uitvoeren voor 4 verschillende stimulatie frequenties: 1Hz, 5Hz, 40Hz, 80Hz (4 groepen). Deze verschillende groepen zijn noodzakelijk om het model op een betrouwbare manier te parameteriseren (calcium regulatie parameters zijn afhankelijk van de

stimulatiefrequentie) en vervolgens testen of de voorspellingen van het model correct zijn voor het gehele fysiologische domein van spierexcitatie (1 – 80Hz).

Tijdens stimulatie wordt een deel van de glycogeen voorraad opgebruikt. Om het model analyse op een betrouwbare manier uit te voeren is het noodzakelijk deze hoeveelheid te kwantificeren (zie sectie 3: wetenschappelijke onderbouwing). Hiervoor is het noodzakelijk na stimulatie de Tibialis Anterior uit de rat te verwijderen. Om onnodig ongerief te voorkomen zal de rat eerst opgeofferd worden. Dit betekent echter ook dat er maar 1 glycogeenbepaling per rat uitgevoerd kan worden.

Powerberekening:

Als basis voor de powerberekening wordt de glycogeen bepaling in de spier gebruikt omdat die in deze studie als minst gevoelig wordt beschouwd.

Op basis van voorspellingen van het huidige computationele model wordt het verschil in glycogeenconcentratie na inspanning tussen 2 groepen geschat op ongeveer 7 mM. De standard deviatie van de glycogeen bepaling wordt op basis van een vorige studie geschat op +/- 4 mM.

De formule van L. Sachs geeft dan: $n = 15.7 * (4 / 7)^2 = 5.12$

De uitval tijdens de MRS meting die vooraf gaat aan de glycogeenbepaling was in een vorige gelijksoortige studie laag: in twee groepen van 10 dieren is 1 dier gestorven. Dit komt neer op 5%. Als de MRS meting succesvol verloopt worden er verder geen complicaties verwacht die tot verdere uitval kunnen leiden. De uitval wordt dus geschat op 5%.

De steekproefgrootte = $5.12 / 0.95 = 6$ metingen in iedere groep.

Voordat het terminale experiment wordt uitgevoerd is er nog de mogelijkheid een (niet - terminaal) experiment uit te voeren op de andere poot. In 8 ratten zal op deze poot geen experiment uitgevoerd worden maar zal de spier gecollecteerd worden voor het bepalen van het basale glycogeen en lactaat niveau (voordat spiercontractie plaats heeft gevonden).

In de overige 16 ratten zal de lactaat concentratie in het bloed voor en in de herstel periode na stimulatie gemeten worden (4 experimenten per groep). Hiervoor zal de rat buiten de scanner hetzelfde stimulatieprotocol ondergaan waarna er op verschillende tijdstippen een geringe hoeveelheid bloed wordt afgenomen voor lactaat bepaling.

Het totaal aantal dieren voor Experiment 1 + Experiment 2 = $4 + 4 * 6 = 28$ dieren

8 Dierproef

8. Experiment

Experiment 1

De glycolyse en mitochondriële flux en metabooliet 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 NMR metingen uitgevoerd (SOP2). Voor experiment 1 wordt de duur van de elektrische stimulatie ingesteld op 10 minuten.

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 niet invasief gemeten door een eigen ontwikkelde krachtsensor zoals beschreven in (12).

Na de meting worden de elektrodes verwijderd, de huid gehecht en wordt dezelfde procedure / meting uitgevoerd op de andere poot. 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 1.5 – 2 uur.

Na een meting aan de tweede poot wordt het dier, nog steeds onder anesthesie, opgeofferd d.m.v. het verbloeden van de vena cava caudalis (SOP 3).

Experiment 2

1 week na aankomst in het dierverblijf op de TU/e worden bij de dieren de lactaat en NMR metingen uitgevoerd.

Voordat de NMR meting uitgevoerd zal worden, zal eerst buiten de MRI scanner een experiment worden gedaan om de dynamica van de lactaat concentratie in het bloed te bepalen. Dit experiment is identiek aan experiment 1 met uitzondering dat het niet in de MRI scanner plaatsvindt.

Het dier zal onder anesthesie worden gebracht (inductiekamer met isofluraan / medische lucht mengsel). Vervolgens zal een kleine hoeveelheid bloed (25 – 50 μL) worden afgenomen via de *vena saphena* (SOP CPV-3-MR), welke gebruikt wordt voor het bepalen van de basale lactaat concentratie. De rat wordt in de ^{31}P opstelling geplaatst. 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.

De temperatuur van de rat zal continue gemeten worden via een rectale thermometer en het dier zal op temperatuur worden gehouden door een warmtelamp. Vervolgens zal de spier Tibialis Anterior elektrisch gestimuleerd worden, waarna het dier direct uit de ^{31}P opstelling gehaald wordt en geplaatst wordt op een warmhoudplaat. Tijdens de metabole herstelperiode na stimulatie ($T = 1\text{min}, 5\text{min}, 10\text{min}, 15\text{min}, 20\text{min}, 60\text{min}$) een kleine hoeveelheid bloed worden (25 – 50 μL) afgenomen via de *vena saphena* (SOP CPV-3-MR), welke gebruikt wordt voor het bepalen van de lactaat concentratie.

Na deze eerste meting worden de elektrodes verwijderd, de huid gehecht en wordt de MRS meting uitgevoerd op de andere poot (de procedure hiervoor is identiek aan de MRS meting beschreven in Experiment 1). Na de MRS meting aan de tweede poot wordt het dier, nog steeds onder anesthesie, opgeofferd d.m.v. het verbloeden van de *vena cava caudalis*, waarna de Tibialis Anterior zal worden gecollecteerd voor bepaling van de glycogeen en lactaat concentratie.

Experiment 2 zal vanaf het onder anesthesie brengen van de rat tot aan het opofferen van het dier ongeveer 2 – 2.5 uur.

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.

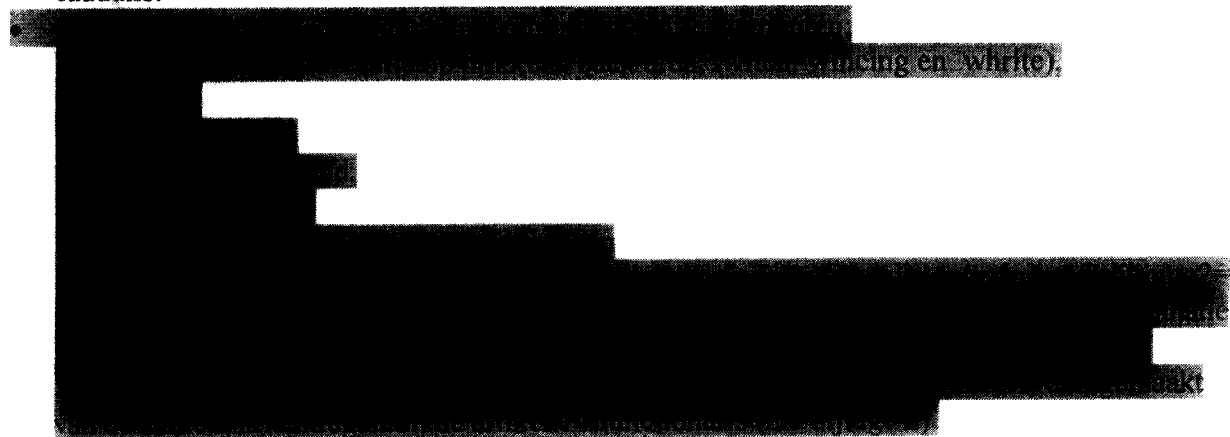
9b. Pijnbestrijding

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 onder anesthesie dmv het verbloeden via de vena cava caudalis.



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.

12. Deskundigheid

De proef zal uitgevoerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker en de vervangend onderzoeker, beide in het bezit van WOD art 9. Hulp en assistentie krijgt zij van 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 vervangend onderzoeker en medewerkers CPV meerdere malen uitgevoerd en zijn probleemloos verlopen.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlage 1

Relevante literatuur

1. Petersen KF., et al. *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2004, 350(7): p 664 – 71
2. Schmitz JP. et al. *Silencing of glycolysis in muscle: experimental observation and numerical analysis*. Experimental Physiology, 2010, 95(2):p 380-97
3. Schmitz JP, *Human skeletal muscle metabolism: ³¹P NMR spectroscopy and computational modeling 1+1>2*, 2008, Master Thesis TU/e
4. Groenendaal W. et al, *Computational modelling identifies the impact of subtle anatomical variations between amphibian and mammalian skeletal muscle on spatiotemporal calcium dynamics*. IET Syst Biol. 2008, 2(6):p 411-422
5. Schmitz JP. et al. *calcium activation of PFK explains dynamics of glycolysis in skeletal muscle* submitted
6. Jeneson JA. et al., *Magnitude and control of mitochondrial sensitivity to ADP*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009, 297(3):E774-84
7. Jeneson JA. et al., *Similar mitochondrial activation kinetics in wild-type and creatine kinase deficient fast-twitch muscle indicate significant Pi control of respiration*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011 Mar 30
8. Balaban RS. *Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell*. Am J Physiol. 1990 258(3 Pt 1):C377-89

- 
9. Beard DA. et al. *Strong inference for systems biology*, PLoS Comp. Biol. 2009 5(8):e1000459
 10. Brooks GA. *Cell-cell and intracellular lactate shuttles*, J Physiol. 2009 1;587(Pt 23):5591-600
 11. Mogensen M, Sahlin K, Fernström M, Glinborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, Højlund K. *Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2007. 56(6): p 1592-9
 12. 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 tussentenenreflex.
- 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. Twee incisies (± 2 mm) worden gemaakt in de huid boven de biceps femoris, langs het verloop van de n. peroneus.
- 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 (0.5-3 V, 125 Hz, 100 ms) 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 gestimuleerd via de N. Peroneus. Het contractieprotocol (pulstrein 0.2 - 1 Hz, 50 - 1000 ms, 1-80 Hz stimulatiefrequentie, 0.5-2 Volt) bestaat uit maximaal 10 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).

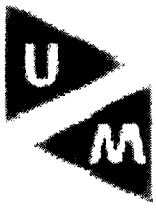
SOP 3: Opoffering onder anesthesie

- * 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

[illegible]

Movement	Normal			
Nest building (moult)	Normal Nest present			
Coat/skin	Normal			
Hydration	Normal	Skin test (normal)	Skin test (delayed)	
Breathing	Normal	Rapid, shallow		
Faeces	Normal			
Posture	Normal			
Survival after treatment	Normal, healing	Some scabs, but healing		
Oedema				
Necroses				

Normal, some scabs, but healing, no necroses, no oedema, no movement, no nest building, no moult, no survival after treatment.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

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, 31-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Regulatie van aerobe versus anaerobe ATP productie in skeletspier*", is op de DEC vergadering van 27 mei 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC vraagt zich af of twee dieren voldoende zijn om zekerheid te hebben van de frequentie die wordt gebruikt in het totale experiment. De DEC kan zich voorstellen dat men 4 dieren gebruikt om zekerheid te hebben: gaarne toelichten.
- Bij punt 9c verzoekt de DEC de humane eindpunten beter te definiëren (niet wachten tot de gehele eetlust is verloren).

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 2011-074, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Eindhoven, 22-06-2011

Aan: DEC-commissie
p/a secretariaat DEC
Postbus 616
6200 MD Maastricht
Telefoon: 043-3881108

Onderwerp: Aanpassingen DEC protocol 2010-074
"Regulatie van aerobe versus anaerobe ATP productie in skeletspier"

Geachte heer, mevrouw,

Via deze brief wil ik de vragen en opmerkingen die de DEC had op bovenvermeld DEC protocol beantwoorden en toelichten.

- * De DEC vraagt zich af of twee dieren voldoende zijn om zekerheid te hebben van de frequentie die wordt gebruikt in het totale experiment. De DEC kan zich voorstellen dat men 4 dieren gebruikt om zekerheid te hebben: gaarne toelichten.

Tijdens eerdere experimenten onder anaerobe condities (DEC 2010-005) is gebleken dat het ontstaan van spierversmoeidheid erg goed reproduceerde tussen verschillende experimenten. Op basis van deze informatie schatten wij in dat in principe 1 experiment per dier voldoende zou zijn. Echter, het protocol in heroverweging nemend, delen de onderzoekers de mening van de DEC dat bij het doen van een $n=1$ experiment onduidelijk blijft of de resultaten ook voor deze experimenten goed reproduceren. Gegeven dat op basis van dit experiment belangrijke informatie over de optimale duur van het protocol wordt verkregen zullen voor iedere stimulatiefrequentie de experimenten in duplo uitgevoerd worden.

Deze motivatie is in het protocol opgenomen en het aantal dieren voor dit experiment is aangepast van 2 naar 4.

- * Bij punt 9c verzoekt de DEC de humane eindpunten beter te definiëren (niet wachten tot de gehele eetlust is verloren).

Het protocol is op dit punt specifiek gedefinieerd. De onderzoeker hoopt hiermee te voldoen aan het verzoek van de DEC. Voor de exacte formulering van de humane eindpunten wil de onderzoeker graag verwijzen naar het bijgevoegde gewijzigde protocol.

Ik hoop u hierbij voldoende geïnformeerd te hebben.

Hoogachtend,



Aan: TUE/

Postbus 513
5600 MB Eindhoven

Ons kenmerk
2011-11

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
04-07-2011

Project: *Regulatie van aerobe versus anaerobe ATP productie in skeletspier.*

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: 2011-074
Diersoort: rat
Aantal dieren: 28
Einddatum: 01-07-2015

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

Vicevoorzitter DEC-UM