

67

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-136

Ontvangen: 28-10-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag
09-11-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³
02-282

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	NUTRIM
--------------	--------

Deelproject	3
-------------	---

Financieel beheerder

Budgetnummer	31962181B
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Signalerings mechanisme in hypoxie-geïnduceerde spieratrofie.

startdatum 01-11-2011

einddatum ⁹ 1-11-2014Duur van de proef¹⁰: 19 dagen

	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.12&9 Art.9	
5. PI				Art. 9	

Diergroep	1	2	3	4	5	6	7
ctrl/exp/sham	ctrl	ctrl	exp	ctrl	ctrl	exp	ctrl
Diersoort	01	01	01	01	01	01	01
Stam	C57bl6/J	C57bl6/J	C57bl6/J	C57bl6/J	C57bl6/J	C57bl6/J	C57bl6/J
Construct / mutatie ?	-	-	-	-	-	-	-
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02	02	02	02
Aantal	11	11	14	11	11	14	11
Geslacht	m	m	m	m	m	m	m
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Leeftijd/gewicht	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk
Doel van de proef *	33	33	33	33	33	33	33
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	04	04	04	04	04	04	04
Mate ongerief *	03	03	03	03	03	03	03
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

Diergroep	8	9	10	11	12	13	14
ctrl/exp/sham	ctrl	exp	ctrl	ctrl	ctrl	exp	exp
Diersoort	01	01	01	01	01	01	01
Stam	C57bl6/J	C57bl6/J	C57bl6	C57bl6	C57bl6	C57bl6	C57bl6
Construct / mutatie ?	-	-	MLC-Cre ^{-/-} /GR ^{n/n}	MLC-Cre ^{-/-} /GR ^{n/n}	MLC-Cre ^{-/-} /GR ^{n/n}	MLC-Cre ^{+/-} /GR ^{n/n}	MLC-Cre ^{+/-} /GR ^{n/n}
Herkomst (leverancier) *	02	02	01	01	01	01	01
Aantal	11	14	11	11	14	11	11
Geslacht	m	m	m/v	m/v	m/v	m/v	m/v
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Leeftijd/gewicht	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk	10-13 wk
Doel van de proef *	33	33	33	33	33	33	33
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	04	04	04	04	04	04	04
Mate ongerief *	03	03	03	03	03	03	03
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

Diergroep	15	16				
ctrl/exp/sham	exp	ctrl				
Diersoort	01	01				
Stam	C57bl6	C57bl6				
Construct / mutatie ?	MLC-Cre ^{+/-} /GR ^{n/n}	-				
Herkomst (leverancier) *	01	01				
Aantal	14	6				
Geslacht	m/v	m/v				
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja				
Leeftijd/gewicht	10-13 wk	10-13 wk				
Doel van de proef *	33	33				
Belang van de proef *	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01				
Bijzondere technieken *	01	01				
Anesthesie *	04	04				
Pijnbestrijding *	04	04				
Mate ongerief *	03	03				
Toestand dier einde exp*	01	01				

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Signalerings mechanisme in hypoxie-geïnduceerde spieratrofie.

1. Doel van de proef.

Patiënten met COPD (chronisch obstructief longlijden) hebben niet alleen te kampen met de directe effecten van falende longfunctie, maar ook met de incapaciterende effecten van spieratrofie. Spieratrofie beïnvloedt niet alleen de kwaliteit van leven maar ook de levensverwachting. Het achterhalen van de oorzaken van spieratrofie en de daaraan ten grondslag liggende signaal transductie zal aangrijpingspunten bieden voor de ontwikkelingen van meer doelmatige therapieën om spiermassa en -functie te handhaven of herstellen in COPD.

Een van de vermoedelijke oorzaken van spieratrofie is hypoxemie (verlaagde zuurstofspanning in het bloed) a.g.v. een verminderde gasuitwisseling in de zieke long. Ons en andere laboratoria postuleren dat de daaruit volgende weefsel hypoxie leidt tot spieratrofie. Eerder onderzoek door onze groep toonde inderdaad dat muizen blootgesteld aan hypoxie (verlaagde zuurstofconcentratie in de lucht) spieratrofie ontwikkelen die niet kan worden verklaard door een verminderde voedselinname (DEC 2008-154).

Markers van signalerings paden die betrokken zijn bij spieraftbraak zijn onderzocht op mRNA en eiwit nivo in DEC 2008-154. Hierbij zijn aanwijzingen gevonden voor activatie van glucocorticoid receptor (GR), HIF1a en myostatine/TGFbeta-Smad signalering. Echter de daadwerkelijke activatie van die betreffende transcriptiefactoren dient nog te worden aangetoond.

Het doel van deze proef is dan ook om door middel van electroporatie van reporterplasmiden voor deze 3 transcriptiefactoren in achterpootspieren van muizen onderworpen aan hypoxie de activiteit van deze 3 transcriptiefactoren vast te stellen

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Sinds het begin van de jaren tachtig is het aantal COPD patiënten gestegen met $\pm 40\%$, en COPD is heden doodsoorzaak 4 in Nederland. Naar verwachting zal de COPD incidentie verder toenemen door de toenemende luchtvervuiling en de vergrijzing van onze samenleving. De verkregen kennis zal ons inzicht in de ontwikkeling en voortgang van spieratrofie bij patiënten met COPD vergroten en zal bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe, meer specifieke therapieën ter behandeling van spieratrofie in COPD.

3. Alternatieven

Binnen de vakgroep Pulmonologie wordt veel *in vitro* onderzoek gedaan naar de signaal transductie van spieratrofie.

Echter, in vergelijking tussen analyses van markers zoals boven genoemd van de signaleringspaden tussen spiertjes van muizen blootgesteld aan hypoxie en *in vitro* gekweekte spiercellen is gebleken dat deze in een aantal gevallen niet overeenkomen, hetgeen het ontbreken van een intermediaire factor in de celkweek experimenten suggereert. Dit kan bv. Een interactie tussen organen in respons op hypoxie betreffen hetgeen niet na te bootsen is *in vitro*, en dit is de reden in dit geval te opteren voor een diermodel.

Dankzij de eerder opgedane ervaring uit eerdere experimenten in dit model en optimalisatie daarvan hebben we de uitval in de experimentele groep terug weten te dringen naar 20% (ipv 30%), hetgeen het aantal dieren dat vereist is om statistische verschillen te kunnen detecteren verlaagt.

4. Ethische afweging

COPD is momenteel doodsoorzaak nummer 4, en spieratrofie bij COPD is een ongunstige prognostische factor en een onafhankelijke determinant van verlies van kwaliteit van leven. Momenteel ontbreken effectieve therapeutische interventies om spiermassaverlies te voorkomen of spiermassa te herstellen na spieratrofie in COPD. Het onderzoek zoals hier voorgesteld zal kunnen bijdragen aan het ontrafelen van de mechanismen van spieratrofie teneinde werkzame interventies te kunnen ontwikkelen. Naar onze mening weegt dit alles op tegen het matige ongerief dat een deel van de muizen zal ervaren als gevolg van de door ons voorgestelde dierproef.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

COPD, CHF en kanker zijn ziekten die vaak gepaard gaan met een onvrijwillig verlies aan lichaamsgewicht (cachexia) (1). Een significant deel van dit verlies is toe te schrijven aan de afname van spiermassa (spieratrofie). Spieratrofie treft ongeveer 10-20% van deze patiënten en samen zijn deze aandoeningen verantwoordelijk voor ongeveer 35% van alle overlijdensgevallen in Nederland. Spieratrofie heeft ernstige fysieke gevolgen en draagt bij tot een verminderde kwaliteit van leven, mede dankzij de afname van spierkracht en uithoudingsvermogen. Het is algemeen aanvaard dat skeletspieratrofie, of gewoonweg wasting, in verband wordt gebracht met een toegenomen morbiditeit en mortaliteit. Uit klinisch oogpunt is het daarom zeer belangrijk om op zoek te gaan naar therapeutische strategieën die ons in staat kunnen stellen het verlies aan spiermassa bij patiënten met COPD, CHF of kanker te remmen of om te keren. Zulke strategieën moeten gericht zijn tegen belangrijke regulatoren van skeletspier plasticiteit. Het is met andere woorden noodzakelijk om regulatoire eiwitten te identificeren die de balans tussen spiergroei en spieraftbraak coördineren.

Glucocorticoid receptor:

Er blijkt een belangrijke rol te zijn weggelegd voor glucocorticoid (GC) signalering door activatie van de GC-receptor (GR) in de skeletspier. Het is bekend dat toediening van GCs (bv dexamethason) leidt tot spieratrofie (2).

In COPD is hypoxemie volgend op een verstoorde gasuitwisseling a.g.v. longschade (emphyseem, chronische bronchitis) een mogelijke oorzaak van spieratrofie. Eerder onderzoek door onze groep toonde inderdaad dat muizen blootgesteld aan hypoxie (verlaagde zuurstofconcentratie in de lucht) spieratrofie ontwikkelen die niet kan worden verklaard door een verminderde voedselinname (DEC 2008-154). M.b.v. mRNA analyse bleek uit deze studies dat er sprake was van een verhoogde glucocorticoid receptor (GR) signalering in de spier. Aangezien transcriptie van specifiek genen door veel processen beïnvloed kunnen worden, willen we graag direct naar de signalering kijken. Hiervoor willen we een reporter-plasmide gebruiken dat reageert op de hoeveelheid actief glucocorticoid receptor en dit signaal meetbaar maakt m.b.v. luciferase.

Myostatine signaal

Myostatine expressie is nauw verbonden met spiermassa (3). Overexpressie resulteert in verlaging spiermassa terwijl verminderde expressie leidt tot verhoging spiermassa. Uit onderzoek van DEC 2008-154 blijkt dat de mRNA hoeveelheden van myostatine verhoogd zijn tijdens hypoxie. Om te testen of deze verhoging leidt tot activatie van het ondergelegen signaleringspad, te weten het TGF-beta/SMAD signaleringspad, willen we het signaal meten met een SMAD reporter plasmide. Hiervoor willen we een plasmide gebruiken dat reageert op de hoeveelheid actief SMAD3/SMAD2 complex en dit signaal meetbaar maakt m.b.v. luciferase.

Hypoxie

Hif1 α signalering is nauw verbonden met de hypoxie response in verschillende organen en tumoren (4). Uit DEC 2008-154 blijkt dat de genen die door HIF1 α geïnduceerd worden allen verschillend reageren. Hieruit kan dus niet opgemaakt worden, wat de rol van HIF1 α is in spier tijdens hypoxie. Tevens zijn er geen antilichamen die op muis materiaal werken, waardoor niet naar hoeveelheden eiwit gekeken kan worden. Door gebruik te maken van een HIF reporter plasmide kunnen we in de spier kijken naar de rol van HIF1 α .

6. Wetenschappelijke beoordeling

Deze DEC aanvraag is gelezen en goedgekeurd door de PI (voorblad) van deelproject 4 van TI-Pharma T1-201 "Systemic effecten van COPD" waartoe dit onderzoek behoort.

4 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

De keuze voor de muis is gebaseerd op het eerder gebruikte model van hypoxie-geïnduceerde spieratrofie voor de muis (DEC 2008-154).

We gebruiken C57/BLJ6 muizen die geleverd worden door Charles River.

De dieren hebben een leeftijd van 12 weken aan het begin van de studie, zodat de longen volgroeid zijn. Aan het eind van de studie zullen ze onder narcose geëuthanaseerd worden om de organen en weefsels te isoleren.

7b. Sexe

Epidemiologische onderzoeken bij patiënten met COPD geven aan dat er duidelijke verschillen bestaan tussen de twee geslachten. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat de morbiditeit én mortaliteit bij mannen hoger ligt dan bij vrouwen.

Spiergewichten in mannelijke en vrouwelijke dieren zijn verschillend en omdat de spreiding en verwachte verschillen gebaseerd zijn op spiergewichten uit voorgaande studies naar spieratrofie waarbij gebruik gemaakt is van muizen van het mannelijke geslacht, stellen we voor om in deze studies alleen mannelijke muizen te gebruiken.

7.c. Aantallen

Effecten hypoxie op signalering

Uit eerder experimenten (o.a. DEC-2007-040) zijn m.b.t de primaire parameter, te weten luciferase activiteit in reporter muizen het minimaal detecteerbare effect d (15%) en variantiecoëfficiënt (σ) (11%) bekend. Op basis hiervan wordt de benodigde groepsgrootte bepaald op:

$$n = 15.7 \times \frac{[\sigma]^2}{(d)^2} = \frac{[11]^2}{[15]^2} = 8.4 \text{ dieren}$$

In dit protocol wordt er ongeveer 20% uitval verwacht door de electroporatie (zoals beschreven in DEC 2010-036 van onze collega's van NP), Tevens is er een uitval voor de dieren die blootgesteld worden aan hypoxie (H) van 20% (zoals beschreven in DEC 2008-154). De injecties van dexamethason en/of gebruik GRKO muis resulteert niet in additionele uitval.

Per behandeling resulteert dit in de volgende groepsgroottes:

N: 20% uitval $\rightarrow 8.4/0.8 = 10.5 = 11$ dieren per groep

PF: 20% uitval $\rightarrow 8.4/0.8 = 10.5 = 11$ dieren per groep

H: 20% uitval + 20% uitval $\rightarrow 8.4/0.8/0.8 = 13.1 = 14$ dieren per groep

Voor de N, PF en H condities per reporter plasmide zijn 36 dieren nodig. Er zijn 3 plasmides die onder deze condities getest worden. Dus 3×36 is 108 muizen. (groep 1-9)

De GR plasmide zal in GRKO muizen geëlectroporeerd worden met de GR-reporter plasmide onder N, PF en H condities in combinatie met een 1 malige injectie van dexamethason (DEX). Hiervoor zijn 2 muizen stammen nodig: GRKO; MLC-cre +/- GR flox/flox en WT; MLC-cre -/- GR flox/flox. De muizen worden verdeeld over 3 condities (N, PF, H) en alle dieren krijgen daarna een 1-malige injectie dexamethason. De groeps grootte is gelijk volgens de hierboven beschreven berekening.

3 condities = 36 dieren per stam. Er zijn 2 muizen stammen: WT en GRKO, dus totaal van 72 dieren. (groep 10-15)

Oefening

Omdat deze techniek niet eerder door de betreffende VO is toegepast worden 6 dieren (m/v) (eigen fok) aangevraagd om de handelingen te oefenen en de electroporatie te verifiëren onder normoxie m.b.v. een constitutief geëxprimeerde luciferase reporter. (groep 16)

In totaal worden dus 186 muizen aangevraagd

Effecten hypoxie op signalering

De muizen worden op 11 weken leeftijd geleverd door Charles River en ondergebracht worden bij CPV. De muizen krijgen een week tijd om te wennen aan de condities binnen CPV, daarna zal begonnen worden aan de electroporaties bij alle muis groepen (SOP1). De muis wordt verdoofd met isofluraan in combinatie met buprenorfine (0.05mg/kg lichaamsgewicht) en de vacht van de achterpoten geschoren. De injectie van de plasmides zal door de huid gebeuren in de gastrocnemius. 5x 10µl zal worden ingespoten op verschillende plekken van de gastrocnemius. Daarna zal met behulp van electrodes een elektrische puls gegeven worden waardoor het plasmide opgenomen wordt in de spiercellen. De linker poot krijgt alleen controle plasmides en de rechterpoot krijgt controle + reporter plasmide getransfecteerd. Om de spieren voldoende tijd te geven om volledig te herstellen zullen de muizen 2 weken rust gegund worden. Daarna zullen de muizen in de H-groep stapsgewijs aan hypoxie (H) worden blootgesteld (conform DEC 2008-154): de eerste 24h 12% O₂, de volgende 24h 10% en tenslotte nog 48h op 8% O₂.

De pair-fed groep zal enkele dagen later ingezet worden, zodat op basis van de voedselinname van de hypoxie groep de hoeveelheid voor de pair-fed groep bepaald kan worden.

De N-groep heeft voedsel ad libitum.

Overzicht van de groepen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
plasmide	GR	GR	GR	SMAD	SMAD	SMAD	HIF	HIF	HIF
conditie	N	PF	H	N	PF	H	N	PF	H

De totale duur van het experiment voor elke groep bedraagt: 1 dag electroporaties, 2 weken recovery en 4 dagen hypoxie/normoxie/PF. Dus totaal 19 dagen.

Aan het einde van het experiment worden de dieren verdoofd d.m.v. isofluraan en gevolgd door cardiaal punctie, daarna wordt d.m.v. cervicale dislocatie geëuthanaseerd en worden spieren verzameld (en gewogen) voor luciferase metingen en verdere biochemische en moleculair biologische bepalingen die kaderen binnen het atrofie onderzoek (SOP2).

Om de rol van de GR signalering te bestuderen, gebruiken we een MLC-cre GR flox/flox muizenlijn uit eigen fok. Aangezien deze MLC-cre alleen in de glycolytische spiervezels de glucocorticoïd receptor verwijderd, blijft er nog in de andere type spiervezels een GR signaal. Met deze test wordt bekeken hoeveel restsignaal er nog is in de andere vezels tijdens normale en geactiveerde (dexamethason) condities. Tevens willen we met dit experiment kijken hoe het signalering mechanisme reageert onder hypoxische condities na activatie met dexamethason. Het protocol is vergelijkbaar met bovenstaand protocol en behalve dat deze groepen na 2 weken rust en 4 dagen hypoxie, 1 malig subcutaan 5 mg/kg lichaamsgewicht dexamethason toegedient krijgen. 6 uur na de injectie met dexamethason zullen de spieren verzameld worden volgens bovenstaand protocol

De totale duur van het experiment voor elke groep bedraagt: 1 dag electroporaties, 2 weken recovery, 4 dagen hypoxie en 1 dag dexamethason en weefsel isolatie. Dus totaal 20 dagen.

groep	10	11	12	13	14	15
trangeen	MLC- Cre -/- /GR fl/fl	MLC- Cre -/- /GR fl/fl	MLC- Cre -/- /GR fl/fl	MLC- Cre +/- /GR fl/fl	MLC-Cre +/- /GR fl/fl	MLC-Cre +/- /GR fl/fl
plasmide	GR	GR	GR	GR	GR	GR
DEX	+	+	+	+	+	+
conditie	N	PF	H	N	PF	H

Oefening

De muizen voor de additionele experimenten zullen uit eigen fok komen.

6 dieren (groep 16) zal worden gebruikt voor het oefenen van de electroporatie en de controle van de plasmide hoeveelheden na 2 weken. Het protocol is vergelijkbaar met bovenstaand protocol en zal alleen onder normoxische condities plaatsvinden.

De totale duur van het experiment bedraagt: 1 dag electroporaties, 2 weken + 4 dagen recovery. Dus totaal 19 dagen.

groep	16
trangeen	-
plasmide	control
conditie	N

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Isofluraan zal worden gebruikt voor de verdoving gedurende de injecties van plasmides en electroporatie in combinatie met pijnbestrijding. Tevens word het als verdoving gebruikt voor de afname van het bloed via de hartpunctie.

9b. Pijnbestrijding

Om enig ongerief tijdens de electroporaties te voorkomen worden de muizen voorbehandeld met buprenorfine. De blootstelling aan hypoxie veroorzaak geen pijn. Voor de subcutane injectie van dexamethason en de effecten daarvan is ook geen pijnbestrijding nodig (conform DEC 2008-104).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De hypoxie (H) dieren zullen onder hypoxische condities (8% O₂) met isofluraan verdoofd worden. Normoxische muizen zullen onder normale condities verdoofd worden met isofluraan. Na 15 minuten onder anesthesie zal bloed worden afgenomen via cardiaal punctie. Na de bloed afname zal m.b.v. cervicale dislocatie de muis overlijden.

Gedurende het experiment wordt een logboek bij gehouden over het welzijn van de muizen. Hierbij wordt dagelijks gewicht gemeten en gelet op activiteit en algemene uiterlijk van de dieren. Mocht dieren tekenen van apathie vertonen of naast de verwachte gewichts afname additioneel ernstig gewicht verliezen (-20%), dan zal worden overgegaan tot euthanasie van de muis.

10a. Ongerief**Effecten hypoxie op signalering**

Overzicht aard, duur en frequentie van het ongerief:

	N (groep 1,4,7)	PF(groep 2,5,8)	H(groep 3,6,9)
Electroporatie en recovery	1x: 03	1x: 03	1x: 03
hypoxie	-	-	1x, 4 dagen: 03
Pair-feeding	-	1x, 4 dagen: 03	-
Anesthesie zonder bijkomen	1x: 02	1x: 02	1x: 02
totaal	03	03	03

N= normoxie

PF= pair-fed

H= hypoxie

	N + dex (Groep 10, 13)	PF + dex Groep 11,14	H + dex Groep 12,15
Electroporatie en recovery	1x: 03	1x: 03	1x: 03
hypoxie	-	-	1x, 4 dagen: 03
Pair-feeding	-	1x, 4 dagen: 03	-
Dexamethason injectie	1x: 02	1x: 02	1x: 02
Anesthesie zonder bijkomen	1x: 02	1x: 02	1x: 02
totaal	03	03	03

N= normoxie

PF= pair-fed

H= hypoxie

Oefening

	Groep 16
Electroporatie en recovery	1x: 03
Dexamethason injectie	
Anesthesie zonder bijkomen	1x: 02
totaal	03

10b. Welzijnsevaluatie

Het welzijn van de dieren zal tijdens experiment in de gaten worden gehouden en eventuele problemen besproken met artikel 14 functionaris. Tevens zal er een logboek bijgehouden worden met de gewichten en algehele status van de dieren

11. Verzorging en huisvesting

De muizen zullen tot start hypoxie en controles worden gehuisvest binnen CPV. De muizen zullen daarna worden gehuisvest in aparte ruimtes (kasten), speciaal gemaakt voor de hypoxische condities. Normoxische en hypoxische condities zullen in dezelfde type kasten worden gehuisvest en krijgen vooraf een week om te wennen aan de ruimte. CO₂ en O₂ zullen worden gecontroleerd.

De muizen zullen met 4 muizen samen in een standaard kooi worden gehuisvest.

Indien problemen, kan de VO worden gewaarschuwd. Indien niet bereikbaar wordt Art 14 gewaarschuwd.

12. Deskundigheid

De VO en VVO beschikken over jaren lange ervaring met dierexperimenten.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijlages

1. Eliason G, Abdel-Halim S, Arvidsson B, et al. Physical performance and muscular characteristics in different stages of COPD. Scand J Med Sci Sports 2008; 19:865–870.
2. Roy RR, Gardiner PF, Simpson DR, and Edgerton VR. Glucocorticoid-induced atrophy in different fibre types of selected rat jaw and hind-limb muscles. Arch Oral Biol 28: 639– 643, 1983.
3. Hayot, Rodriguez, Vernus. Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. Molecular and cellular endocrinology 2010
4. Majmundar, Wong. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Molecular cell 2010 40; 2 294-309

SOP 1: electroporatie van gastrocnemius spier in muis

Materiaal:

- Endotoxine vrije maxi pre kit (qiagen)
- Electroporation systeem
 - BTX square wave electroporator (BTX Harvard apparatus, ECM 830)
- Naalden
- Isofluraan
- Buprenorfine (0,05 mg/kg)
- Muis electrode
- Redux crème, electrolyte crème (parker laboratories, 66-04)
- Plasmide: concentratie 1 µg/µl

Plasmide

- isoleer de plasmide met de endotoxine vrije maxi prep kit.
- Verdun plasmide naar 1 µg/ul.

Electroporatie

- Stel de electroporator in op 50 Volt, 20 ms pulse lengte, interval van 1 seconde.
- Injecteer subcutaan 50 tot 100 µl buprenorfine (afhankelijk van lichaamsgewicht) en wacht minimaal 20 minuten.
- Verdoof de muis met isofluraan en positioneer de muis dusdanig dat de spieren goed te bereiken zijn.
- Scheer de huid van de achterpoten
- Injecteer 5x 10 µl plasmide in de gastrocnemius door de huid heen.
- Doe een beetje crème op de electrodes
- Plaats de electrodes aan beide zijden van de spier en zorg voor 5 mm ruimte tussen de electrodes.
- Geef nu 4 stroomstoten, verander van stroomrichting en geef nu opnieuw 4 stroomstoten.
- Plaats de muis terug in de kooi.

SOP 2: Opofferen van de muizen.

Doel

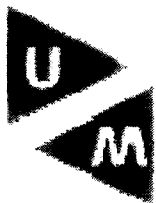
Op een bepaald tijdstip na intratracheale toediening van LPS wordt de muis opgeofferd om de gewenste lichaamsvloeistoffen en weefsels te verkrijgen. De muis wordt onder algehele terminale anesthesie gebracht m.b.v. isofluraan. Vervolgens wordt via een hartpunctie bloed verkregen, dat direct ontteld wordt met heparin. Daarna wordt het diafragma doorgeprikt, waardoor de longen zullen klappen (non-functie van longen). Na een cervicale dislokatie kunnen vervolgens de spieren, longen en eventueel andere weefsels uit de muis worden genomen.

Benodigdheden

- verschillende maten schaarstjes
- verschillende maten pincetten
- tondeuse
- isofluraan
- weegschaal
- 2 ml spuit
- heparine (5000 units/ml)
- oranje naalden (G25)
- bruine plakband

Werkwijze

1. Leg alle materiaal, scharen, pincetten ed, klaar.
 2. Weeg de muis.
 3. Verdoof de muis initieel met 5% isofluraan en daarna continu met 2%.
 4. Controleer of de muis goed verdoofd is.
 5. Scheer de buik van de muis
 6. Leg muis horizontaal op de tafel en plak pootjes en staart vast met plakband.
 7. Knip de muis open en verwijder de linker borstspier
 8. Doe een hartpunctie tussen linker rib 3 en 4 met behulp van een 25G naald op een 2 ml spuit gevuld met 10µl heparine.
 9. Prik een klein gaatje in het diafragma, waardoor een non-functie van de longen optreedt.
 10. Offer de muis op via een cervicale dislocatie
 11. Prepareer de longen en spieren uit de muis.
- Fixeer de longen in isopentanaan, vloeibare N₂ of gebufferde 4% formaldehyde



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Signalerings mechanisme in hypoxie-geïnduceerde spieratrofie*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt op het voorblad bij de duur van de proef "16" te verwijderen. De duur van de proef is 19 dagen.
- De DEC verzoekt bij punt 7c, de uitkomst van de uitvalberekening te corrigeren.

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 2011-136, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

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

Geachte

Hierbij wil ik graag de vragen en opmerkingen beantwoorden vanuit de DEC over project 2011-136.

1: De DEC verzoekt op het voorblad bij de duur van de proef "16" te verwijderen. De duur van de proef is 19 dagen.

Antwoord: De duur van de proef op de voorpagina is veranderd naar 19 dagen.

2: De DEC verzoekt bij punt 7c, de uitkomst van de uitvalberekening te corrigeren.

Antwoord: De uitkomst van de berekening klopte inderdaad niet en is gewijzigd. De totale hoeveelheden dieren veranderen hierdoor niet.

Mvg

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer*
043-*Maastricht*
10-11-2011*Project: Signalerings mechanisme in hypoxie-geïnduceerde speiratrofie.*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM*Verantwoordelijk onderzoeker (VO):*

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T (043

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-136**Diersoort:** muis**Aantal dieren:** 186**Einddatum:** 09-11-2015*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