

86

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-115

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 14-09-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
21-09-2011	Nieuw

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	2						
-------------	---	--	--	--	--	--	--

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

Budgetnummer 30982250B

Titel van het onderzoek:

Wat is de rol van Cardiotrophin-1 tijdens de ontwikkeling van hartfalen na een myocard infarct?

startdatum 01-10-2011

einddatum ⁹ 01-10-2013Duur van de proef¹⁰: 8 weken mnd/jr

	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	
4. overige uitvoerenden				Art.12	
				Art.12	
				Art.9	

Diergroep	1	2	3	4	5	6	.
ctrl/exp/sham	Sham	MI	Sham+CT1	MI+CT1			
Diersoort	01	01	01	01			
Stam	Swiss	Swiss	Swiss	Swiss			
Construct / mutatie ?	-	-	-	-			
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01			
Aantal	36	48	26	34			
Geslacht	m	m	m	m			
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja			
Leeftijd/gewicht	>10 weken	>10 weken	>10 weken	>10 weken			
Doel van de proef *	31	31	31	31			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	01	01	01			
Anesthesie *	04	04	04	04			
Pijnbestrijding *	04	04	04	04			
Mate ongerief *	04	05	04	05			
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01			

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

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

Titel: Wat is de rol van Cardiotrophin-1 tijdens de ontwikkeling van hartfalen na een myocard infarct?

1. Doel van de proef.

Inflammatie speelt een zeer belangrijke rol bij het ontstaan van hartfalen (HF) en inflammatoire eiwitten kunnen daarom bruikbare biomarkers zijn voor de diagnostiek¹⁻². In voorgaand onderzoek met ratten (DEC2008-110) hebben we aangetoond dat het inflammatoire eiwit Cardiotrophin-1 (CT-1) mogelijk een nieuwe vroege biomarker is voor het ontstaan van HF na een myocard infarct (MI)³. We kunnen echter nog weinig zeggen over de toepasbaarheid van CT-1 in een verder gevorderd stadium van HF, aangezien de hartfunctie van Wistar ratten na 16 weken post-MI wel verminderd maar nog steeds gecompenseerd is. Bovendien is de exacte functie van CT-1 tijdens de ontwikkeling van HF post-MI nog onbekend en kan dit inflammatoire eiwit zowel een positieve als negatieve werking hebben op het hart⁴⁻⁵. **Het doel van dit vervolgonderzoek** is dan ook (1) karakteriseren van CT-1 serum levels in muizen met gevorderde stadia van HF post-MI en (2) bestuderen van de functie van CT-1 tijdens de vroege wondheling en het ontstaan van HF post-MI door toediening van extra CT-1. Omdat Wistar ratten met een MI onvoldoende HF ontwikkelen gebruiken we Swiss muizen. Uit eerder onderzoek op de afdeling farmacologie blijkt dit de meest geschikte muizenstam om HF post-MI te bestuderen⁶. Het voorgestelde onderzoek maakt deel uit van TRIUMPH, een CTMM (Center for Translational Molecular Medicine) project waar CARIM (onderzoekslijjk II) aan meewerken.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Hartfalen is nog steeds een van de belangrijkste oorzaken van sterfte. Het voorgestelde onderzoek geeft meer inzicht in (1) de toepasbaarheid van CT-1 als vroege biomarker voor HF post-MI, en (2) de functie van CT-1 tijdens het ontstaan van HF post-MI. Het onderzoek zal bijdragen aan een vroegere diagnose waardoor een eerdere en betere behandeling van HF mogelijk wordt.

3. Alternatieven

Wegens de complexiteit van het inflammatie proces tijdens wondheling en post-MI remodeling (waarbij vele inflammatoire cellen en mediators een rol spelen) is het vrijwel onmogelijk om dit proces te bestuderen in bv een celweek model. Om met alle factoren rekening te houden is het belangrijk deze processen in een intact proefdier te bestuderen. Daarnaast zijn bv. humane hartspierbiopten zeer moeilijk te verkrijgen en dan nog blijft het de vraag of een verkregen spierbiopt een representatief beeld geeft van het remodeling proces in de verschillende gebieden van het hart (infarct versus gezond remote myocard).

4. Ethische afweging

Hartfalen, en met name hartfalen als gevolg van een myocard infarct, is nog steeds een van de belangrijkste doodsoorzaken in ons land. Per jaar worden ruim 25.000 mensen getroffen door een acuut MI waarvan 30-40% op den duur hartfalen ontwikkelt. Een vroege diagnose is essentieel voor een adequate behandeling zodat verdere irreversibele hartschade voorkomen kan worden. In het voorgestelde vervolgonderzoek worden CT-1 serum concentraties bestudeerd in totaal 144 muizen. Dit aantal dieren is noodzakelijk om een goed inzicht te krijgen in de functie van CT-1 en de toepasbaarheid als biomarker voor HF post-MI. Het ongerief van de dieren weegt niet op tegen de wetenschappelijke winst.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

In voorgaand onderzoek hebben we aangetoond dat het inflammatoire eiwit Cardiotrophin-1 (CT-1), mogelijk een vroege biomarker is voor het ontstaan van HF na een myocard infarct (MI) (DEC 2008-110)³. De CT-1 concentratie in hartweefsel en serum van MI-ratten is na 1 week significant verhoogd (zie Fig A in bijlage1), wat suggereert dat CT-1 betrokken is bij de vroege wondheling. Na 2 en 4 weken zijn de CT-1 serum concentraties weer normaal maar na 8 en 16 weken is er opnieuw een significante stijging waarneembaar in MI ratten, wat suggereert dat CT-1 ook betrokken is bij post-MI remodeling en het ontstaan van HF na een infarct. CT-1 concentraties in serum correleren met een verminderde linker ventrikel ejectie fractie (LVEF 40-45%, $r=-0.523$, $n=19$, $p<0.05$, zie Fig B in bijlage1) terwijl concentraties van andere bekende cardiale biomarkers (zoals NT-proBNP) nog onveranderd zijn³.

Het is echter nog onduidelijk of circulerend CT-1 verder stijgt bij een verdere verslechtering van de hartfunctie. De hartfunctie van Wistar ratten na 16 weken post- MI is wel verminderd (verlaagde LVEF, en geringe LV dilatatie) maar nog steeds voldoende gecompenseerd (normale cardiac output en slagvolume) waardoor we weinig kunnen zeggen over de toepasbaarheid van CT-1 als biomarker in een verder gevorderd stadium van HF. Bovendien is de exacte functie van CT-1 na een MI nog onbekend. In de literatuur wordt beschreven dat CT-1 in eerste instantie een positieve, beschermende rol kan hebben door wondheling te stimuleren en hartcellen te beschermen tegen ischemie maar later zou het mogelijk een negatieve uitwerking hebben door hypertrofie te induceren⁴⁻⁵.

Het doel van dit vervolgonderzoek is ten eerste het karakteriseren van circulerend CT-1 in muizen met gevorderde stadia van HF post-MI (Experiment 1) zodat we inzicht krijgen in het CT-1 afgiftepatroon bij verdere progressie van hartfalen. Wanneer duidelijk is op welk moment CT-1 serum concentraties verhoogd zijn (vroege wondheling versus late post-MI remodeling) zal in een tweede experiment de functie van CT-1 bestudeerd worden d.m.v. constante CT-1 toediening gedurende 14 dagen (10ug/kg-dag, via een onderhuids osmotisch minipompje gekoppeld aan een canule in de vene jugularis). Door deze interventie studie zal duidelijk worden of CT-1 een beschermende dan wel negatieve werking heeft op het remodeling proces in het hart. CT-1 zal op 2 verschillende tijden toegediend worden namelijk tijdens de wondheling fase (vroeg na het infarct; week 1-2) en tijdens post MI-remodeling (laat na infarct; verwacht wordt week 4-5).

Omdat Wistar ratten onvoldoende HF blijken te ontwikkelen³ (verminderde maar nog steeds gecompenseerde hartfunctie) worden in deze studie Swiss muizen gebruikt. Uit eerder onderzoek op de afdeling is gebleken dat bepaalde muizenstammen verschillend reageren op een MI⁵. Swiss muizen vertonen na 4 weken post-MI al een sterk dilatoir respons (verhoging van het eind systolisch en diastolisch volume) met een duidelijk daling van de LVEF (tot $\pm 20\%$) ten op zichten van andere muizenstammen en is daarom de meest geschikte stam voor deze studie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit onderzoek is onderdeel van TRIUMPH, een CTMM (Center for Translational Molecular Medicine) project waar CARIM en
 (). Het voorgestelde onderzoek is goedgekeurd door

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort: Muizen (10-12 weken oud). Stam: Swiss. Herkomst: Charles River

Uiteindelijke bestemming van de dieren na de proef: opoffering ter verkrijging van de organen ter analyse; derhalve is hergebruik niet mogelijk.

7b. Sexe

In het merendeel van de MI-studies die in de literatuur beschreven werden, zijn mannelijke muizen gebruikt en ook op de afdeling bestaat een uitgebreide ervaring met deze experimenten in mannelijke muizen. Daarom wordt er ook in deze studie gekozen voor mannelijke dieren.

7.c. Aantallen

Experiment 1:

Een belangrijke parameter die we aan het eind van experiment 1 zullen bepalen is de cardiotrophin-1 concentratie in het bloed. Deze parameter wordt gebruikt in de poweranalyse met de formule $n = 2(Z\alpha/2 - Z\pi)^2 (\sigma/\delta)^2$ (L. Sarchs). Bij een variatiecoëfficiënt van 25%; een power van 80% en een minimaal te meten verschil van 35% volgt hieruit: $n = 15.7 * (0.25/0.35)^2 = 8.0$ dieren per groep.

Rekening houdend met een uitval van 10% in sham dieren, wegens sterfte tijdens de sham operatie, (anesthesie), geldt voor de Sham groep een $n = 8.0/0.90 = 8.9 \rightarrow$ **9 dieren per groep.**

Rekening houdend met een uitval van 33% in de MI dieren, wegens sterfte of een te klein uitgevallen MI (infarctgrootte < 30% is onvoldoende), geldt voor de MI groep een $n = 8.0/0.67 = 12.0 \rightarrow$ **12 dieren per groep.**

CT-1 concentraties worden op **4** verschillende tijden bepaald namelijk 1, 2, 4 en 8 weken na het infarct of de sham-operatie. Wegens variatie in CT-1 baseline levels (mogelijk als gevolg van algemene wondheling na de operatie of door leeftijdsverschillen) wordt er op ieder tijdstip een sham-groep meegenomen. In experiment 1 worden in totaal **84 dieren** gebruikt.

Experiment 2:

CT-1 wordt op **2** verschillende momenten toegediend, namelijk tijdens vroege wondheling (direct na het infarct, week 1-2) en tijdens late post-MI remodeling (verwacht wordt week 4-5 na het infarct, maar de exacte timing voor de late toediening is afhankelijk van de data uit experiment 1). Een belangrijke parameter die we aan het eind van experiment 2 zullen bepalen is de linker ventrikel functie. De linkerventrikel ejectie fractie (LVEF) wordt als parameter gebruikt in de poweranalyse met de formule $n = 2(Z\alpha/2 - Z\pi)^2 (\sigma/\delta)^2$ (L. Sarchs). Bij een variatiecoëfficiënt van 25%; een power van 80% en een minimaal te meten verschil van 30% volgt hieruit: $n = 15.7 * (0.25/0.30)^2 = 10.9$ dieren per groep.

Rekening houdend met een uitval van 10% in sham dieren, wegens sterfte tijdens de sham operatie, (anesthesie), geldt voor de Sham groep een $n = 10.9/0.90 = 12.1 \rightarrow$ **13 dieren per groep.**

Rekening houdend met een uitval van 33% in de MI dieren, wegens sterfte of een te klein uitgevallen MI (infarctgrootte < 30% is onvoldoende), geldt voor de MI dieren een $n = 10.9/0.67 = 16.3 \rightarrow$ **17 dieren per groep.**

In experiment 2 worden in totaal **60 dieren** gebruikt.

Totaal (Exp 1+2): 144 dieren

8. Experiment

Doel:

Experiment 1: Karakteriseren van CT-1 serum concentraties in Swiss muizen met verschillende (gevorderde) stadia van HF post-MI.

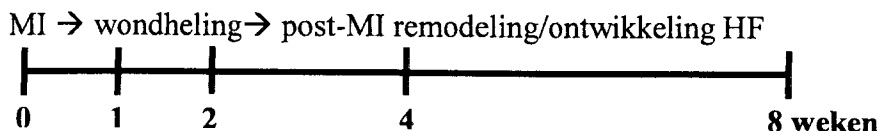
Experiment 2: Bestuderen van de functie van CT-1 tijdens vroege wondheling (direct na het infarct, week 1-2) en de ontwikkeling van HF post-MI (verwacht wordt week 4-5 na het infarct) dmv constante CT-1 toediening.

Stam: Swiss muizen

Aantal dieren: totaal **144 dieren**: Exp 1: Sham dieren: 4 tijdstippen x 9 dieren per groep = 36
MI dieren: 4 tijdstippen x 12 dieren per groep = 48

Exp 2: Sham dieren + CT-1 vroeg (week 1-2) = 13
Sham dieren + CT-1 laat (week 4-5) = 13
MI dieren + CT-1 vroeg (week 1-2) = 17
MI dieren + CT-1 laat (week 4-5) = 17

Experimentele opzet experiment 1:



Sham dieren (sham-operatie op dag 0)

Groep 1 (n=9): week 1 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen
Groep 2 (n=9): week 1 echo, week 2 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen
Groep 3 (n=9): week 1 echo, week 4 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen
Groep 4 (n=9): week 1 echo, week 8 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen

MI dieren (MI wordt geïnduceerd op dag 0)

Groep 5 (n=12) week 1 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen
Groep 6 (n=12) week 1 echo, week 2 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen
Groep 7 (n=12) week 1 echo, week 4 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen
Groep 8 (n=12) week 1 echo, week 8 echo + ventrikeldruk meting, bloedsample, opofferen

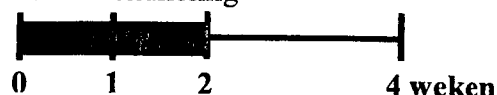
Op **dag 0** gaan de dieren onder isofluraan narcose (inleiden 3-4%, onderhouden met 1.5-2.5%) voor een echocardiogram (SOP : om de baseline hartfunctie te bepalen. Aansluitend volgt een sham-operatie of het induceren van een MI (ligatie coronair arterie, SOP

In week 1 krijgen *alle* dieren opnieuw een echo onder isofluraan narcose om te bepalen of de dieren een goed infarct hebben.

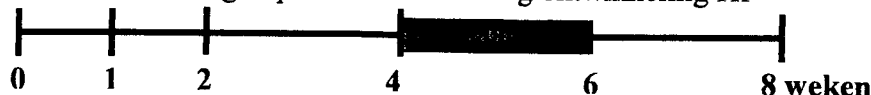
Vervolgens worden de dieren na 1, 2, 4 of 8 weken opgeofferd. Vlak voor de opoffering wordt bij *alle* dieren op twee manieren de hartfunctie bepaald. Ten eerste m.b.v. echo (onder isofluraan narcose) en ten tweede d.m.v. een terminale ventrikeldruk meting (onder urethaan narcose). Direct na de ventrikeldruk meting wordt eenmalig bloed afgenomen (via aortapunctie, het dier is dan nog onder urethaan narcose) waarna het dier d.m.v. verbloeding wordt opgeofferd (het dier is ook dan nog onder urethaan narcose). Na het opofferen worden de volgende organen verzameld voor verdere histologische of biochemische analyse: hart, longen, nier en lever.

Experimentele opzet experiment 2:

MI → wondheling



MI → wondheling → post-MI remodeling/ontwikkeling HF



Groep 1 (n=13): Sham-dieren met vroege CT-1 behandeling ($10\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{dag}$)

Groep 2 (n=13): Sham-dieren met late CT-1 behandeling ($10\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{dag}$)

Groep 3 (n=17): MI-dieren met vroege CT-1 behandeling ($10\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{dag}$)

Groep 4 (n=17): MI-dieren met late CT-1 behandeling ($10\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{dag}$)

	Baseline echo	Sham/MI	Canulatie vene jugularis + implantatie minipomp	CT-1 behandeling	Extra Echo	echo + ventrikeldruk + opoffering
Groep 1	Dag 0	Dag 0	Dag 0	Week 1+2	Week 1	Week 4
Groep 2	Dag 0	Dag 0	Week 4	Week 4+5	Week 1	Week 8
Groep 3	Dag 0	Dag 0	Dag 0	Week 1+2	Week 1	Week 4
Groep 4	Dag 0	Dag 0	Week 4	Week 4+5	Week 1	Week 8

Op **dag 0** gaan de dieren onder isofluraan narcose (inleiden 3-4%, onderhouden met 1.5-2.5%) voor een echocardiogram (SOP) om de baseline hartfunctie te bepalen, vervolgens wordt in groep 1+3 de vene jugularis gecanuleerd waaraan een osmotisch minipompje wordt gekoppeld dat onderhuids geïmplantéerd wordt (SOP en SOP). Aansluitend volgt de sham-operatie of het induceren van een MI (ligatie coronair arterie, SOP I). In groep 2+4 wordt op dag 0 alleen een echo en de sham-operatie of MI geïnduceerd, pas in week 4 wordt de vene jugularis gecanuleerd waaraan een osmotisch minipompje wordt gekoppeld dat onderhuids geïmplantéerd wordt.

In week 1 krijgen alle dieren opnieuw een echo onder isofluraan narcose om te bepalen of de dieren een goed infarct hebben.

Groep 1+3 worden na 4 weken opgeofferd, en groep 2+4 na 8 weken. Ook in dit experiment wordt op de dag van de opoffering op twee manieren de hartfunctie wordt bepaald. Ten eerste m.b.v. echo (onder isofluraan narcose) en ten tweede d.m.v. een terminale ventrikeldruk meting (onder urethaan narcose, SOP). Direct na de ventrikeldruk meting wordt eenmalig bloed afgenomen (via aortapunctie, het dier is dan nog onder urethaan narcose) waarna het dier d.m.v. verbloeding wordt opgeofferd (het dier is ook dan nog onder urethaan narcose). Na het opofferen worden de volgende organen verzameld voor verdere histologische of biochemische analyse: hart, longen, nier en lever.

Te bepalen parameters:

1. Hartfunctie (echocardiografie en dP/dt metingen)
2. CT-1 concentraties in serum en hartweefsel (ELISA)
3. Serum concentraties van andere bekende biomarkers zoals NT-proBNP en cardiaal troponine (ELISA)
4. Infarctgrootte (histologie)
5. Hoeveelheid interstitiële fibrose (Histologie)

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor een echocardiogram, ligatie van de coronair arterie, en canulatie van de vene jugularis + minipomp implantatie wordt isofluraan narcose gebruikt (inleiden met 3-4%, onderhouden met 1.5-2.5% zie SOP

). Op de dag van de opoffering wordt een ventrikeldruk metingen gedaan onder urethaan narcose (2.5 mg/kg I.P, zie SOP), onmiddellijk daarna worden de dieren opgeofferd door verbloeding.

In totaal gaan de dieren **3x** onder anesthesie, met uitzondering van groep 2+4 uit experiment 2, die gaan **4x** onder anesthesie:

- Dag 0 dmv isofluraan (baseline echo, canulatie/minipomp en sham/MI)
- Week 1 dmv isofluraan (echo)
- Op de dag van opoffering dmv urethaan (ventrikeldrukmeting en opoffering)
- Week 4 dmv isofluraan (canulatie/minipomp in groep 2+4 van experiment 2)

9b. Pijnbestrijding

Op dag 0 wordt pre-operatief (30 min voor narcose) en post-operatief (aan einde van dag) subcutaan buprenorphine (Temgesic) 0.1 mg/kg toegediend (werkingsduur +/- 12 uur). Indien nodig wordt de volgende dag (in morgen en op het einde van middag) de injectie herhaald.

Groep 2+ 4 van experiment 2 krijgen in week 4 (canulatie+implantatie minipomp) opnieuw pre- en post-operatief subcutaan buprenorphine 0.1 mg/kg toegediend (zie SOP

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Op de dag van de opoffering worden de dieren onder urethaan narcose gebracht om hartfunctiemetingen uit te voeren, onmiddellijk daarna worden de dieren, die nog steeds onder narcose zijn, opgeofferd door verbloeding.
- De dieren zullen regelmatig worden geïnspecteerd op ernstige symptomen van hartfalen. Bij een duidelijke verslechtering van de toestand van het dier zoals (1) een sterke gewichtsafname van meer dan 15-20% (cachexia), (2) een verhoogde ademhalings-snelheid, (3) oedeem in de pootjes, (4) niet meer wassen of (5) ernstige passiviteit van het dier, zal de artikel 14 functionaris worden geconsulteerd en zullende desbetreffende dieren zo nodig voortijdig worden opgeofferd d.m.v. verbloeding onder urethaan narcose. Hetzelfde geldt voor eventuele infecties/ontstekingen of andere problemen.

Zorg

10a. Ongerief

Vanwege de aard van de ingrepen beschouwen we het totale ongerief voor sham dieren als matig/ernstig (04) en voor MI-dieren als ernstig (05).

Per groep: aard, ernst, frequentie en duur van individuele handelingen + totaal ongerief

Experiment 1					
Gr 1-4	Sham operatie (04) 1x (30-45 min)	Echo (02) 2of3x (10min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)		04
Gr 5-8	MI inductie (05) 1x (30-45 min)	Echo (02) 2of3x (10min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)		05
Experiment 2					
Gr 1-2	Sham operatie (04) 1x (30-45 min)	Echo (02) 3x (10min)	Canulatie+ minipomp (04) 1x (45 min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)	04
Gr 3-4	MI inductie (05) 1x (30-45 min)	Echo (02) 3x (10min)	Canulatie+ minipomp (04) 1x (45 min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)	05

10b. Welzijnsevaluatie

Uit eerdere experimenten waarbij een MI in de muis werd geïnduceerd d.m.v. ligatie van coronair arterie bleek het ongerief ernstig (05). Met name in de eerste 24 uur na het aanbrengen van het infarct is het welzijn van de dieren verlaagd. In deze periode worden de dieren daarom extra in de gaten gehouden en wordt de pijn bestreden d.m.v. buprenorphine (Temgesic). Na de eerste 24 uur zijn er in de eerste weken na het infarct (week 1-4) weinig aanwijzingen voor een verminderde welzijn, desalniettemin worden de dieren nauwlettend in de gaten gehouden. Na 4-8 weken post-MI ontwikkelen MI-muizen mogelijke symptomen van ernstig hartfalen. Dit kan zijn een sterke gewichtsafname van meer dan 15-20%, een verhoogde ademhalingsnelheid, oedeem in de pootjes, niet meer wassen, of ernstige passiviteit van het dier. Gedurende deze periode worden de dieren extra in de gaten gehouden en indien er symptomen zijn voor ernstig hartfalen zullen de dieren opgeofferd worden om te voorkomen dat ze zullen lijden.

11. Verzorging en huisvesting

Na chirurgie worden de dieren op de standaard wijze gehuisvest bij het CPV. De noodzakelijke chirurgische ingrepen en het bijkomen van de dieren van de chirurgie (in een verwarmde ruimte) zullen plaatsvinden in het proefdierlaboratorium van _____ Bij calamiteiten (bv door het CPV waargenomen verslechtering van de toestand van het dier) kan er contact worden opgenomen met de VO of met een artikel 12 functionaris van het proefdierlab van farmacologie en wordt de art. 14 functionaris gecontacteerd.

12. Deskundigheid

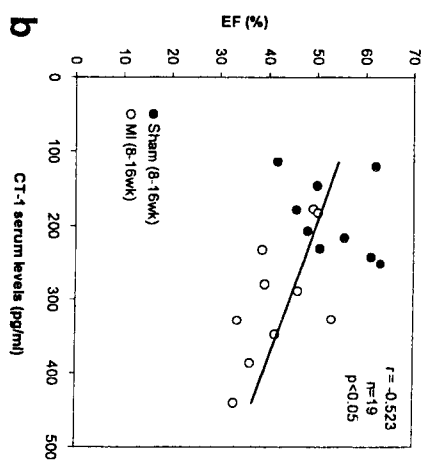
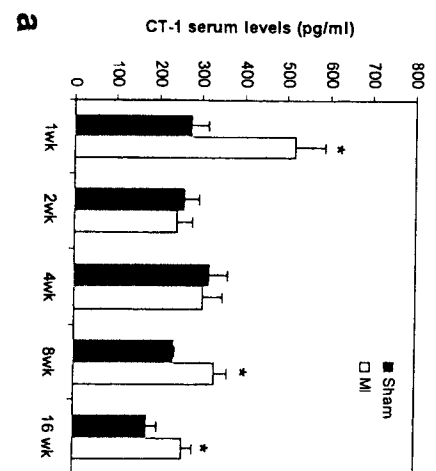
Alle handelingen in het kader van dit experiment zullen worden uitgevoerd door ervaren artikel 12 medewerkers of artikel 9 medewerkers.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Voor SOP's ten aanzien het van echocardiogram, induceren van het MI, ventrikeldruk meting, canulatie van de vene jugularis en implantatie van minimpomt wordt verwezen naar respectievelijk SOP _____

Relevante literatuur

1. Bozkurt B, Mann DL, Deswal A. Biomarkers of inflammation in heart failure. Heart Fail Rev. 2009
2. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. N Engl J Med. 2008;358(20):2148-2159.
3. Hessel MHM, Altara R, Janssen B.J.A., Hermans J.J.R., Neef C., and Blankesteyn W.M. Cardiotrophin-1: an early biomarker of heart failure following myocardial infarction linking the gap between Cardiac Troponin I and N-terminal b-type Natriuretic Peptide (paper in progress).
4. Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS. Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. Cardiovasc Res. 2002;53(4):902-910.
5. Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(4):1142-1146
6. van den Borne SW, van de Schans VA, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HT, Lijnen PM, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ, Janssen BJ, Blankesteyn WM. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2009.





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

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Wat is de rol van Cardiotrophin-1 tijdens de ontwikkeling van hartfalen na een myocard infarct?*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Punt 7c. De DEC is van mening dat het bij experiment 1 en 2 om verschillende uitleesparameters gaat. De DEC verzoekt een nieuwe powerberekening uit te voeren voor experiment 2 (met een relevante uitleesparameter).
- De DEC wenst een onderbouwing van de noodzakelijkheid van de 4 shamgroepen in experiment 1. De DEC adviseert rekening te houden met geringe uitval bij de shamgroep.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst om te zetten in een tabel waarin de aard, ernst, duur en frequentie van de individuele handelingen **per** groep weergegeven wordt, en te sommeren tot een totaal ongerief per groep.

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 **2011-115**, 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

Betreft DEC-aanvraag 2011-115

Maastricht, 09-09-2011

Geachte Voorzitter van de DEC-UM,

Naar aanleiding van uw opmerkingen in de brief van 31 augustus j.l, stuur ik u deze brief met antwoorden op uw vragen.

- Punt7c. De DEC is van mening dat het bij experiment 1 en 2 om verschillende uitleesparameters gaat. De DEC verzoekt een nieuwe powerberekening uit te voeren voor experiment 2 (met een relevante uitleesparameter).
*De belangrijkste uitleesparameter bij experiment 2 is inderdaad niet de CT-1 concentratie maar de linker ventrikel functie. Bij de powerberekening wordt de linker ventrikel ejectie fractie (LVEF) gebruikt als uitleesparameter. Bij een variatiecoëfficiënt van 25%, een power van 80% en een minimaal te meten verschil van 30% volgt hieruit: $n = 15.7 * (0.25/0.30)^2 = 10.9$ dieren per groep*
Rekening houdend met een uitval van 10% in sham dieren, wegens sterfte tijdens de sham operatie, (bv door anesthesie), geldt voor de Sham groep een $n = 10.9/0.90 = 12.1$ dit betekent 13 dieren per groep. Rekening houdend met een uitval van 33% in de MI dieren, wegens sterfte of een te klein uitgevallen MI (infarctgrootte < 30% is onvoldoende), geldt voor de MI dieren een $n = 10.9/0.67 = 16.3$ dit betekent 17 dieren per groep. In experiment 2 worden in totaal 60 dieren gebruikt (ipv 40 dieren in de oorspronkelijke aanvraag).
- De DEC wenst een onderbouwing van de noodzakelijkheid van de 4 shamgroepen in experiment 1. De DEC adviseert rekening te houden met geringe uitval bij de shamgroep.
Uit ons voorgaande experiment met ratten blijkt de serum concentratie van Cardiotrophin-1 in sham dieren licht te dalen gedurende de tijd (1-16 weken na sham operatie). Dit kan 2 mogelijke oorzaken hebben: (1) CT-1 is licht verhoogd als gevolg van algemene wondheling direct na de operatie, en daalt in de weken daarna of (2) baseline CT-1 levels zijn afhankelijk van de leeftijd van de dieren (dit eiwit is o.a. betrokken is bij de ontwikkeling en kan in jonge dieren dus wat hoger zijn). Om toenemende CT-1 concentraties te kunnen waarnemen als gevolg van een MI is het door de variatie in sham dieren noodzakelijk om op ieder tijdstip een sham-groep mee te nemen.
Rekening houdend met een uitval van 10% in de sham groep, wegens sterfte tijdens de sham operatie, (bv door anesthesie), geldt voor de Sham groepen in experiment 1 een $n = 8.0/0.90 = 8.9$ dit betekent 9 dieren per groep (ipv 8 in de oorspronkelijke aanvraag)

- Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst om te zetten in een tabel waarin de aard, ernst, duur en frequentie van de individuele handelingen **per** groep weergegeven wordt, en te sommeren tot een totaal ongerief per groep.

*Bij punt 10a is de tekst vervangen door onderstaande tabel waarin **per groep** de aard, ernst, frequentie en duur van de individuele handelingen is weergegeven + het totaal ongerief.*

Experiment 1					
Gr 1-4	Sham operatie (04) 1x (30-45 min)	Echo (02) 2of3x (10min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)		04
Gr 5-8	MI inductie (05) 1x (30-45 min)	Echo (02) 2of3x (10min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)		05
Experiment 2					
Gr 1-2	Sham operatie (04) 1x (30-45 min)	Echo (02) 3x (10min)	Canulatie+ minipomp (04) 1x (45 min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)	04
Gr 3-4	MI inductie (05) 1x (30-45 min)	Echo (02) 3x (10min)	Canulatie+ minipomp (04) 1x (45 min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)	05

Hopende hiermee uw vragen beantwoord te hebben,

Met vriendelijke groet,

From:

Sent: dinsdag 13 september 2011 13:49

To: Dec Secretariaat

Subject: RE: Project 2011-115-w

Hoi

de berekeningen kloppen niet, zie hieronder

$n = 15.7 * (0.25 / 0.30)^2 = 11 \rightarrow = 10.9$ (hier niet afronden)

$n = 11 / 0.90 = 12 \rightarrow 10.9 / 0.90 = 12.1$ en naar boven afronden dus 13

$n = 11 / 0.67 = 16 \rightarrow 10.9 / 0.67 = 16.3$ dus 17

rest OK

groeten

*Departement
Maastricht University
P.O. Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands
T
f*

Van: Dec Secretariaat

Verzonden: dinsdag 13 september 2011 10:38

Aan:

Onderwerp: FW: Project 2011-115-w

Dag

Heb je tijd om deze herziene versie na te kijken? Zo niet, laat het mij weten.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- Punt 7c. De DEC is van mening dat het bij experiment 1 en 2 om verschillende uitleesparameters gaat. De DEC verzoekt een nieuwe powerberekening uit te voeren voor experiment 2 (met een relevante uitleesparameter).
- De DEC wenst een onderbouwing van de noodzakelijkheid van de 4 shamgroepen in experiment 1. De DEC adviseert rekening te houden met geringe uitval bij de shamgroep.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst om te zetten in een tabel waarin de aard, ernst, duur en frequentie van de individuele handelingen **per** groep weergegeven wordt, en te sommeren tot een totaal ongerief per groep.

Graag je reactie.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616-UNS 50-Box 48, 6200 MD Maastricht

T

E-mail:

Werktijden:

13-9-2011

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

Betreft DEC-aanvraag 2011-115

Maastricht, 09-09-2011

Geachte Voorzitter van de DEC-UM,

Naar aanleiding van uw opmerkingen in de brief van 31 augustus j.l, stuur ik u deze brief met antwoorden op uw vragen.

- Punt 7c. De DEC is van mening dat het bij experiment 1 en 2 om verschillende uitleesparameters gaat. De DEC verzoekt een nieuwe powerberekening uit te voeren voor experiment 2 (met een relevante uitleesparameter).
*De belangrijkste uitleesparameter bij experiment 2 is inderdaad niet de CT-1 concentratie maar de linker ventrikel functie. Bij de powerberekening wordt de linker ventrikel ejectie fractie (LVEF) gebruikt als uitleesparameter. Bij een variatiecoëfficiënt van 25%, een power van 80% en een minimaal te meten verschil van 30% volgt hieruit: $n = 15.7 * (0.25/0.30)^2 = 11$ dieren per groep. Rekening houdend met een uitval van 10% in sham dieren, wegens sterfte tijdens de sham operatie, (bv door anesthesie), geldt voor de Sham groep een $n = 11/0.90 = 12$ dieren per groep. Rekening houdend met een uitval van 33% in de MI dieren, wegens sterfte of een te klein uitgevallen MI (infarctgrootte < 30% is onvoldoende), geldt voor de MI dieren een $n = 11/0.67 = 16$ dieren per groep. In experiment 2 worden in totaal 56 dieren gebruikt (ipv 40 dieren in de oorspronkelijke aanvraag).*
- De DEC wenst een onderbouwing van de noodzakelijkheid van de 4 shamgroepen in experiment 1. De DEC adviseert rekening te houden met geringe uitval bij de shamgroep.
Uit ons voorgaande experiment met ratten blijkt de serum concentratie van Cardiotrophin-1 in sham dieren licht te dalen gedurende de tijd (1-16 weken na sham operatie). Dit kan 2 mogelijke oorzaken hebben: (1) CT-1 is licht verhoogd als gevolg van algemene wondheling direct na de operatie, en daalt in de weken daarna of (2) baseline CT-1 levels zijn afhankelijk van de leeftijd van de dieren (dit eiwit is o.a. betrokken is bij de ontwikkeling en kan in jonge dieren dus wat hoger zijn). Om toenemende CT-1 concentraties te kunnen waarnemen als gevolg van een MI is het door de variatie in sham dieren noodzakelijk om op ieder tijdstip een sham-groep mee te nemen. Rekening houdend met een uitval van 10% in de sham groep, wegens sterfte tijdens de sham operatie, (bv door anesthesie), geldt voor de Sham groepen in experiment 1 een $n = 8/0.90 = 9$ dieren per groep (ipv 8 in de oorspronkelijke aanvraag).

- Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst om te zetten in een tabel waarin de aard, ernst, duur en frequentie van de individuele handelingen **per groep** weergegeven wordt, en te sommeren tot een totaal ongerief per groep.

Bij punt 10a is de tekst vervangen door onderstaande tabel waarin per groep de aard, ernst, frequentie en duur van de individuele handelingen is weergegeven + het totaal ongerief.

Experiment 1					
Gr 1-4	Sham operatie (04) 1x (30-45 min)	Echo (02) 2of3x (10min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)		04
Gr 5-8	MI inductie (05) 1x (30-45 min)	Echo (02) 2of3x (10min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)		05
Experiment 2					
Gr 1-2	Sham operatie (04) 1x (30-45 min)	Echo (02) 3x (10min)	Canulatie+ minipomp (04) 1x (45 min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)	04
Gr 3-4	MI inductie (05) 1x (30-45 min)	Echo (02) 3x (10min)	Canulatie+ minipomp (04) 1x (45 min)	Ventrikeldruk meting (02) 1x (45-60min)	05

Hopende hiermee uw vragen beantwoord te hebben,

Met vriendelijke groet,

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
21-09-2011

Project: *Wat is de rol van Cardiotrophin-1 tijdens de ontwikkeling van hartfalen na een myocard infarct?*

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

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-115
Diersoort: muis
Aantal dieren: 144
Einddatum: 21-09-2015

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