

129

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-060

Ontvangen: 26-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ²
24-06-2011	Nieuw

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

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

Deelproject	2.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3.	1. 2. 3.			
-------------	----	-------------	----------	----------	--	--	--

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

Budgetnummer 3098.2.263N

Titel van het onderzoek:

Cognitive Function in mice during the development of heart failure

startdatum 01/05/2011

einddatum⁹ 01/05/2012Duur van de proef¹⁰: 7 weken

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

Diergroep	1	2	3	4	5	6	7	8
ctrl/exp/sham	Sham	Exp						
Diersoort	01	01						
Stam	C57BL/6	C57BL/6						
Construct / mutatie ?	Wildtype	Wildtype						
Herkomst (leverancier) *	01	01						
Aantal	12	15						
Geslacht	M	M						
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja						
Leeftijd/gewicht	8-wks	8-wks						
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 *	05	05						
Toestand dier einde exp*	01	01						

* VHI-coderingen zie bijlage

Titel: Cognitive function in mice during the development of heart failure

1. Doel van de proef:

To study behavioural consequences of cerebral hypoperfusion due to heart failure.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Cognitive dysfunction is a growing health problem in aging societies. Cognitive function appears to be sensitive to changes in hemodynamic state. Especially cerebral hypoperfusion seems to be a direct mediator of cognitive dysfunction and decline. At the moment it is not known which pathological processes lead to the structural brain abnormalities seen in humans with cerebral hypoperfusion due to cardiac failure. Animal models are needed to gain insights into these processes which is needed to lead to novel interventions. At the moment there is to our knowledge no valid animal model. In the current proposal expertise is combined to develop an animal model in which cognitive function can be studied during the development of heart failure.

3. Alternatieven

There are no in vitro or in silico alternatives to study the cognitive consequences of cerebral hypofunction after heart failure.

4. Ethische afweging

The surgical model of pressure overload (transverse aortic constriction; TAC) that we chose in this experimental design is by far the most extensively studied and clinically relevant rodent model of heart failure development available to the biomedical field and serves as the "golden standard" of heart failure models. It closely mimics the early clinical remodeling phases observed in heart failure patients secondary to chronic hypertension or aortic valve complications. Other (transgenic) models are available to the researchers in Maastricht, but due to their slightly artificial nature (transgenesis or gene-targeting), these models unavoidably only mimic parts of the cardiac remodeling phases as observed in patients and in the TAC heart failure model. Even more so, for publication purposes and full acceptance in the scientific community, following positive correlations between loss of cognition and heart failure development in artificial models, one would still have to repeat the cognition studies in the preferred surgical model. We opinion that this reduction in animal number use outweighs the discomfort associated with the surgical model of heart failure. In addition, the discomfort for the mice in this study is weighed against obtaining knowledge on cognitive function during the development of heart failure as a chronic human disease. If we are able to show that it is a valid model and it delivers us new mechanisms to understand this disease, it opens possibilities to study pathogenesis and pathophysiology of this important health problem worldwide.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Cardiac dysfunction is related to cognitive impairment in humans. However, it is not possible in humans to dissect molecular mechanisms and pathways, nor is there a good animal model to study these mechanisms. We will try to establish such a model that would give us the opportunity to study these effects, which then might be studied in a more focused way in humans.

6. Wetenschappelijke beoordeling

This study has been read and approved by
and ().

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Adult (8 weeks of age) c57BL/6J are obtained from . In order to keep the number of animals as low as possible we will include only male mice in this study. At the end of the study, the animals will be submitted to euthanasia in order to collect tissue for further analysis. Re-use is therefore unfeasible.

7b. Sexe

Only male mice will be used as these are more appropriate to study cognitive function and to perform biochemical brain tissue studies than female mice as their short oestrus cyclus interferes with the cognitive performance.

7c. Aantallen

For behavioural testing we need 10 animals to detect a relevant mean difference of 0.25 (δ) with a variance (σ) of 0.2 (based on earlier studies by the) when using a power of 0.80 and alpha of 0.05. For the sample size calculation we adopted the equation proposed by Sachs ($N=2[(Z_{\alpha/2}-Z_{\beta})^2/(\delta/\sigma)^2]$) in 'Principles of Laboratory Animal Science, editors: L.F.M. van Zutphen, V. Baumans, A.C. Beynen'. That is: $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (0,2/0,25)^2 = 10,05 \sim 10$ animals per group. However, based on previous studies we also know that 1-2 animals do not show sufficient exploratory behaviour for the behavioural tasks at hand. This means we have to add 2 animals, which will result in $(10,05/0,85=11,8)$ 12 animals at minimum for a group.

In our hands, the mortality for the TAC surgery is max. 20% spanning a period of eight weeks. Therefore 3 animals will be added to the group size of 11, which will result in $(11,8/0,8=14,75)$ 15 animals per TAC group to correct for the expected mortality. Because all animals stay alive after the sham surgeries, we decided to take a group size of $n=12$ animals in the sham-operated group.

Of note, the minimum number of animals needed to have TAC surgery is 11. This is based on the parameter with the most inter-individual variability in the TAC model, i.e. contraction power of the heart (measured by echocardiography). From previous experiments we know that the relative effect size (δ) is 30% and variation (σ) is 25%. Using a power of 0.80 and a 0.05 for alpha, the minimal number of animals is $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (0,25/0,30)^2 = 10,9$ (or 11 animals per group). Since we use already more than 11 animals for both groups, it is assured that the effect of TAC will be significant.

The final numbers are summarized in the table.

Procedure:	Vehicle
Sham mice	12
TAC mice	15
Total mice	27

8. Experiment

Experimental Setup

TAC

The mice will be individually housed in special cages in a sound-proof room under conditions of controlled humidity, temperature and a 12 h light–dark cycle (lights on 7 AM to 7 PM). Mice will receive surgery at the Maastricht University. The day of the surgery all animals that will be operated on in the morning, receive an s.c. injection of Temgesic (buprenorphine, 0,05 mg/kg) at least 30 minutes before the surgical procedure. All operated animals will receive another injection with Temgesic at 19:00 hours. The two days after surgery, all operated animals will receive two injections, one at 07:00 hours and one at 19:00 hours to completely cover these days with a sufficient analgesic treatment.

First the animal is weighed. The animals will be anaesthetized with isoflurane (induction 3-4%, maintenance 1.5-2.5%) in an induction box. When the mouse is under complete anaesthesia, the anterior thorax is shaved at the top of the sternum. After cleaning, the mouse is fixed to a heating pad (set at 37°C) with self-made loops or tape. The mouse is then intubated with a cannula (a blunt 22-gauge needle). The cannula is connected to a volume cycled rodent respirator () on oxygen, mixed with isoflurane in a closed system with a tidal volume of 0.25 ml and a respiratory rate of 150-210 breaths/min. Pre-operative and post-operative all animals receive 0.5 ml warm sterile saline 0.9% by s.c. injection to prevent dehydration caused by anaesthesia. Further procedures are performed with visual help of a micro-dissecting microscope.

The actual surgery is performed under sterile conditions. A 0.5 cm incision in the left parasternal in the skin is made. The thorax partially cut until the second rib. A small incision of 0.5 cm is made and pulled with two retractors. There should be a clear view of the thymus now. Split the two lobes and free the aorta from fat tissue. Give special attention to the arteries running in that area. Next prepare the aorta for banding: dissect the tissue cranially of the aorta. This should be done between the first and second truncus of the aortic arch (i.e., truncus brachiocephalicus and the left common carotid artery). When you have a clear view, dissect the aorta caudally. With a specially modified hook a 7-0 prolene ligature is pulled around the aorta and a blunted 27-gauge needle and tied. The needle is removed immediately to allow for the required blood passage. The aorta should not be completely constricted for more than 12 seconds. Animals that have the aorta constricted for more than 12 seconds will be euthanized. Close the thorax and skin with a single knot of a non-absorbent suture (5-0). At the end of the surgical procedure, animals receive 0.5 ml warm sterile saline 0.9% by s.c. injection (when the animals are still under anaesthesia) to prevent dehydration caused by anaesthesia. We let the mouse recover in a heated room with a temperature of 30°C.

Two days after surgical procedures both SHAM and TAC groups will be submitted to a high resolution transthoracic echocardiographic exam (, using a single-element mechanical transducer with a center frequency of 30

MHz, under anesthesia (2% isoflurane and 98% oxygen)(18), to evaluate trans-aortic pressure gradients, caused by aortic constriction, via aortic artery blood flow. In addition, every 2 wks mice are submitted to echocardiography to evaluate cardiac ventricular dimensions (by M-mode) and function (by fractional shortening).

After the final echocardiographic measurement (6-wks after surgery), which will take about 20 minutes, the mice will stay anesthetized and will be sacrificed by cervical dislocation. Tissue will be collected to determine body, heart, lung and liver weights (morphometrical indications of cardiac hypertrophy and heart failure) and to perform histological and molecular biological analysis.

Behavioural and cognitive testing

Time lines

Week	Day	Intervention/Test
1	1	Object location test (training; 5 min)
	2	Object location test (training; 5 min)
	3	Object location test (2 x 5 min with 1 h interval)
	4	
	5	Y-maze alternation test (5 min)
	6	
	7	
2	8	Surgery
	9	
	10	
	11	Echo
	12	
	13	
	14	
3	15	
	16	
	17	Object location test (2 x 5 min with 1 h interval)
	18	
	19	Y-maze alternation test (5 min)
	20	
	21	
4	22	Echo
	23	
	24	Object location test (2 x 5 min with 1 h interval)
	25	
	26	Y-maze alternation test (5 min)
	27	
	28	
5	29	
	30	
	31	Object location test (2 x 5 min with 1 h interval)
	32	
	33	Y-maze alternation test (5 min)
	34	
	35	
6	36	Echo/Perfusion

One week before surgery cognitive testing will be performed to have a behavioural baseline which will be used to assign animals to balanced experimental groups. In addition, the performance of the sham animals will serve as an extra presurgery behavioural baseline to check for effects due to surgery alone. After surgery, cognitive testing will be continued for three subsequent weeks. Both short-term memory (Y-maze alternation task) and long-term memory (object location test) will be assessed. After the behavioural experiments mice will be perfusion-fixed with 4% paraformaldehyde. Subsequently, brains will be immunohistochemically analysed.

Test protocols

- **Object location task**: This one-trial learning task allows the assessment of spatial memory (Vanmierlo et al., In Press). In the first (learning) trial a mouse is put into an arena in which two identical objects are placed. After a certain delay, the animal is given a second trial. In this second trial the animals are again placed in the same arena but now one of the objects has been moved to a different position within the area. In other words, a new spatial arrangement is being used. It is manually scored on a personal computer how much time the mice inspect the two objects. Subsequently it can be determined whether the mice spent a different amount of time on the moved or stationary object. Spatial memory is scored as the relative time spent on the moved object. Usually, mice show a good spatial memory performance when a one-hour delay is interposed between the first and second trial. However, when a twenty-four hour delay is used they do not discriminate between the moved and the stationary object in the second trial, indicating that they do not remember the object's location, which was presented in the first trial. Using a six-hour delay, the discrimination performance is between the performance of the one hour and twenty-four hour delay, suggesting a delay-dependent forgetting in this task. In the present study only the one hour interval will be tested.
- **Y-maze**: The alternation task of the Y-maze is conducted to assess working memory (Ohno et al., 2004). In the Y-maze each mouse is placed in the centre of the maze and is free to explore the arena for 6 minutes. The number of entries is counted per mouse; one entry meaning that both hind paws of the animal must be placed completely inside the arm. If a mouse visits the three different arms consecutively, then this is counted as a triad. The measure for working memory is calculated as the percentage of alternations (calculated by number of triads/(number of entries-2) * 100). If this measure is significantly over 50%, then the mouse shows well-functioning working memory.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

For the TAC surgical procedure, mice will be initially anaesthetized with 3-4% Isoflurane and maintained with 1.5-2.5% of Isoflurane during the procedure via an endotracheal tube procedure. During echocardiographic evaluation mice will be also placed under general anesthesia through isoflurane inhalation (induction 3-4%,

maintenance 1.5-2.5%). The anesthesia is mix with medical air and is administered through face mask. The depth of anesthesia is constantly controlled by testing of eye and toe reflex.

9b. Pijnbestrijding

Mice will be submitted to a pre-operative and postoperative administration of Temgesic (buprenorphine, 0,05 mg/kg s.c.) s.c. at least 30 minutes before the surgical procedure and every 12h. Thus after the surgery (same day in the evening and the next morning, after the animal is awake), subcutaneous buprenorphine is administered again to reduce the pain of the mice. The next two days (in the morning and at the end of the afternoon) a repeated injection of buprenorphine is administered, totaling 48 hrs of pain reliever is administered following surgery.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten. □ With all types of surgery, especially with complex microsurgery like this, there is always a chance of unforeseen inconvenience. If an animal shows any signs of complications, the animal will be immediately euthanized to prevent any further pain. One specific criterion for euthanasia involves constriction of the aorta for more than 12 seconds during the procedure (so far, this has never happened). From our experience, we expect 10% of the animals to die during the procedure, but these animals will be under complete anesthesia and therefore will suffer mild inconvenience. Postoperatively, we expect 10% of the animals to die of the surgery, due to lethal arrhythmias and recovery of the surgery. However, we have experienced that these animals die in the first two days after the procedure and we attempt to shield this with buprenorphin at twelve-hour intervals for 48 hours. At the end of the study, the animals will be sacrificed by cervical dislocation under anesthesia (after the final echocardiographic exam). Organs will be collected for further analysis, so that re-use of the mice is unfeasible. A humane end point will be carried out when animals show: changes in physical appearance (e.g., coat texture; hair soiled with urine or faeces); changes in clinical signs (e.g., dyspnea; posture; diarrhea; >10% of body weight loss; changes in food and water consumption; although we don't expect tumors, presence of > 1cm³ tumours; presence of persistent and non-treated infection at the site of the surgery; severe discomfort after surgery); changes in unprovoked behaviour (e.g., self mutilation; compulsive behaviour; posture; grooming patterns; activity levels); behavioural changes in response to external stimuli (e.g., excitability; righting reflex). If euthanasia is necessary, a person with WOD art.12 and/or a person with WOD art. 14 will be consulted to determine the euthanasia.

10a. Ongerief

	Nature of discomfort <i>(clinical parameters)</i>	Estimated degree of discomfort	Duration and frequency
Non standard housing	Solitary housing (RUN)	3	4 weeks
Euthanasia	Stress, pain	2	<1 day
s.c. Temgesic	Stress, pain	3	<1 day, 3x
s.c. Saline	Stress, pain	3	<1 day, 1x
TAC surgery	Stress, pain	5	20 minutes, 1x
Post-TAC	Stress, pain	2	4 weeks
Echo	Stress, pain	2	20 minutes, 3x
Object location task	Open field stress	3	5 min, 10x
Y-maze	Open field stress	3	5 min, 4x
Development of hypertension/heart failure (during the 4-wk period)	Stress, pain	5	4 weeks

The animals will experience severe discomfort due to the surgery. In addition, animals will experience moderate discomfort during the echocardiographic exam. The combined discomfort is therefore quantified as severe (score 5). Upon the previous experiences and literatures it is expected that mice will be totally recovered from the TAC surgery after 1 week.

10b. Welzijnsevaluatie

The body weight (measured weekly) will be used to assess the well being of the mice. Animals will also be checked (any hunching) to see if they experience discomfort. The first 24 hours of recovery of TAC surgery may be critical to the animals. Most of the animals will show complete recovery after TAC surgery. However, after a period of 4 weeks after the surgery, the animals may develop heart failure, characterized by cachexia, increased respiratory rate, lack of physical activity, edema in the legs, and poor fur. A person with WOD art.12 and/or a person with WOD art. 14 will be consulted to determine if euthanasia is necessary in the case that animals display any of the above symptoms.

11. Verzorging en huisvesting

The Animal Facility (CPV) of the University of Maastricht will be responsible for the housing and caring of the animals during the protocol. The mice will be housed in special cages (4-5 per cage), in a sound-proof room under conditions of controlled humidity, temperature and a 12 h light-dark cycle (lights on 7 AM to 7 PM). Males are housed individually to prevent aggressive behaviour due to social housing. In addition, the object location test implicates individual housing as socially housed animals do not show a good memory performance in this task. Mice will be allowed free access to tap water and chow. The surgical procedures and the echocardiographic exams will be performed in the laboratory of the *[redacted]*, and the *[redacted]* analysis will be procedure in *[redacted]*. The behavioural experiments will also be performed at the *[redacted]*.

12. Deskundigheid

The transverse aortic constriction surgery, the echocardiography exam and other procedures (cardiac perfusion for histology analysis, and euthanasia) will be performed by a zoological technician, (art. 12), from the [redacted] and with extended experience in the surgical techniques mentioned. All surgeries will be executed at the [redacted]. In case of emergency / questions on the condition of the animals, we will contact a person with WOD art. 12 and/or a person with WOD art. 14.

Behavioural studies will be performed by [redacted] s (art. 12) from [redacted]

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Procedures described bellow will be in accordance to the SOPs established by the University of Maastricht (www.cpv.unimaas.nl): [redacted] : transverse aorta constrictie in de muis; [redacted] : Echocardiography in the mouse.

Relevante literatuur

1. Cleland JG, Khand A, Clark A. The heart failure epidemic: exactly how big is it? Eur Heart J. 2001;22(8):623-626.
2. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? Circulation. 2004;109(13):1580-1589.
3. Wehrens XH, Marks AR. Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(7):565-573.
4. Van Rooij et al. Science 2007 Mar 22
5. Van Rooij et al. Proc Natl Acad Sci USA 2006 Nov 28; 103(48):18255-60
6. Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, and Disterhoft JF. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuron, 2004, 41: 27-33..
7. Vanmierlo T, Rutten K, Dederen J, Bloks VW, van Vark-van der Zee LC, Kuipers F, Kiliaan A, Blokland A, Sijbrands EJ, Steinbusch H, Prickaerts J, Lütjohann D, and Mulder M. Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. Neurobiol Aging, In Press.

Transverse aorta constrictie (TAC) bij de muis

Pre-operatief

Er wordt (~30 minuten tevoren) sub-cutaan 0.1ml Temgesic (0.03 mg/l) toegediend.
De muis wordt gewogen, waarna het dier pre-operatief steriele en verwarmde (37°C) NaCl 0.9% (0.5 ml Intra peritoneaal) krijgt toegediend.

Narcose:

- Inleiding met isofluraan (3-5% in zuurstof)
- Onder anesthesie gehouden met isofluraan (1.5-2.5% in zuurstof)

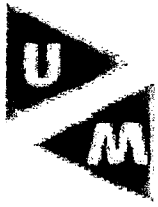
Als de muis goed onder narcose is:

- Hals en borstkas scheren
- Ogen behandelen met
- De muis wordt op de rug gelegd.
- Intuberen met een afgestompte naald (20 Gauge).
- De muis wordt geventileerd met een slagvolume van 250ml en een slagritme van 150-180 slagen per minuut.
- De muis fixeren.
- Desinfecteren met jodium en afdekken met operatiefolie.
- De muis onder anesthesie houden met isofluraan 1.5-2.5%.
- De huid aan de bovenkant van het sternum wordt ingeknipt om een helder beeld te krijgen van de thorax.
- Let vooral op de kleine bloedvaatjes die in het gebied lopen.
- Het sternum wordt van onder af gedeeltelijk ingeknipt tot aan de 2^e rib.
- De twee borstdelen worden aan de kant gehouden met haakjes om een helder beeld van de thymus te krijgen.
- Deze wordt gesplitst in zijn twee lobjes, waaronder de aortaboog zich bevindt.
- Prepareer de aortaboog vrij van weefsels bijv: vlies, vet tussen de de trunks brachiocep brachiocephalicus en de linker carotis arterie (1^e en 2^e aftakking) wordt afgebonden.
- Tijdens het afbinden wordt er een afgestompte 27(Gauge) naald tussen de aorta en de hechting gelaten die direct na het afknopen wordt verwijderd (7-0 proleen).
- Dit afbinden mag niet langer dan 12 seconden duren, om ernstige hartproblemen te voorkomen.
- Deze procedure garandeert een standaardvolume van de aorta na constrictie.
- De thymus lobjes worden terug op hun plaats gelegd.
- Het sternum wordt gesloten.
- De borstkast wordt met een enkelvoudig hechtingen dichtgemaakt en de huid gesloten.
- Nadat de huid is gesloten wordt de isofluraan toevoer gesloten en kan het dier langzaam aan de ventilator bijkomen.

- Als het dier redelijk bij is gekomen (als het reageert op een lichte prikkel), wordt de intubatiennaald verwijderd en wordt wederom 0.5 Steriele en verwarmde NaCl 0.9% intra peritoneaal toegediend.
- Geopereerde muizen worden teruggezet in een schone kooi in de verkouverkamer (30graden).
- Het herstel van de operatiewond wordt gevolgd en vastgelegd in het welzijnsdagboek en operatieverslag.

Pijnbestrijding:

Tijdens de operatiedag krijgen de dieren aan het einde van de dag een subcutane injectie van 0.1ml temgesic (0.03 mg/l). Ook de twee volgende dagen worden de dieren 's morgens en 's avonds worden de dieren met Temgesic behandeld om een adequate pijnbestrijding te kunnen garanderen.



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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Cognitive Function in mice during the development of heart failure*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- GGO is op dit protocol niet van toepassing, daarom kan het GGO nummer verwijderd worden van het voorblad.
- Bij punt 7c merkt de DEC op, gezien het feit dat de vraagstelling "Cognitieve Functie" betreft, dat de berekening van de groepsgrootte daarop gebaseerd dient te worden. Vervolgens dient de uitval, ten gevolge van het TAC model, daarover berekend te worden. Ook de uitval ten gevolge van het slecht uitvoeren van de gedragstaak, dient mee genomen te worden als percentage.
- Bij punt 8 vraagt de DEC zich af of de anesthesie tijdens de DOC procedure een verstorende factor kan zijn in het wetenschappelijke doel van deze proef. Daarom wenst de DEC een betere onderbouwing voor de uiteindelijke keuze van dit model door middel van hartfalen.

De DEC vraagt zich verder af of een acuut model van hartfalen, door bijvoorbeeld een TAC procedure, de meeste geschikte keuze is voor een klinisch representatief model van cognitieve dysfunctie geassocieerd met hartfalen, gezien het chronische ontstaanskarakter van deze aandoening(en). De DEC vraagt zich verder af waarom de TAC operatie nog steeds uitgevoerd wordt met de meest belastende methode voor de dieren (doorknippen sternum). De DEC wil graag weten of er geen controle groep nodig is (met en/of zonder anesthesie). De DEC is van mening, dat als al uit de vergelijking tussen de sham en controle groep zal blijken dat de invloed van de anesthesie en de operatie te groot is, op voorhand blijkt dat dit model niet geschikt is. Dit zou kunnen leiden tot een andere keuze voor het opwekken van hartfalen. Gaarne uw commentaar hierop.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

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 2011-060, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend

Voorzitter DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

Ons kenmerk:

Uw kenmerk:

Datum: 24 mei, 2011

Geachte heer

Onze projectaanvraag getiteld "*Cognitive Function in mice during the development of heart failure*" is besproken tijdens afgelopen DEC vergadering. Via dit schrijven beantwoorden wij de vragen van de DEC commissie.

Vraag 1: "*GGO is op dit protocol niet van toepassing, daarom kan het GGO nummer verwijderd worden van het voorblad*".

Antwoord 1: Het GGO nummer is verwijderd.

Vraag 2: "*Bij punt 7c merkt de DEC op, gezien het feit dat de vraagstelling 'Cognitieve Functie' betreft, dat de berekening van de groepsgrootte daarop gebaseerd dient te worden. Vervolgens dient de uitval, ten gevolge van het TAC model, daarover berekend te worden. Ook de uitval ten gevolge van het slecht uitvoeren van de gedragstaak, dient mee genomen te worden als percentage.*"

Antwoord 2: De berekening van de groepsgrootte is nu allereerst gebaseerd op het gedrag, waarbij gecorrigeerd wordt voor de uitval op basis van niet voldoende exploratief gedrag (15%). Vervolgens wordt gecorrigeerd voor de uitval op basis van de mortaliteit als gevolg van het TAC model (20%). Dit is nu aangepast in de aanvraag (punt 7c).

Vraag 3a: "*Bij punt 8 vraagt de DEC zich af of de anesthesie tijdens de DOC procedure een versturende factor kan zijn in het wetenschappelijke doel van deze proef. Daarom wenst de DEC een betere onderbouwing voor de uiteindelijke keuze van dit model door middel van hartfalen.*"

Antwoord 3a: Vóór het uitvoeren van de TAC operatie wordt er een controle (basaal) gedragsmeting gedaan. Door het postoperatieve gedrag van de sham groep met zijn eigen baseline te vergelijken kunnen we het effect van

Maastricht University

Department of I

Tel :

Fax :

Secr:

Tel +:

Fax :

Visiting- and Postal address:

anesthesie/operatie bestuderen. Op basis van ervaring met (stereotactische) operaties van de , weten we dat het effect van een anesthesie/operatie te verwaarlozen is.

Vraag 3b: "De DEC vraagt zich verder af of een acuut model van hartfalen, door bijvoorbeeld een TAC procedure, de meeste geschikte keuze is voor een klinisch representatief model van cognitieve dysfunctie geassocieerd met hartfalen, gezien het chronische ontstaanskarakter van deze aandoening(en)."

Antwoord 3b: De DEC interpreteert het model van TAC geïnduceerd hartfalen naar mijn mening niet correct. Dit model wordt in het vakgebied van de Experimentele gezien als de "gouden standaard" procedure voor het nabootsen van drukbelasting op de linker kamer in de mens. Door de TAC operatie wordt de volledige moleculaire, cellulaire, elektrofysiologische en hemodynamische complexiteit (voor zover experimenteel benaderbaar) van het klinisch verloop van hartspeer adaptatie bij patiënten met klinisch relevante condities zoals aortaklep stenose of chronische hoge bloeddruk voor zover mogelijk nagebootst in het kleinst bruikbare zoogdier model (de muis). Dit experimentele model is geen model van acuut hartfalen, maar juist een experimenteel model van chronisch hartfalen.

Na ± 1 dag matig ernstig tot ernstig ongerief als gevolg van wondheling en de invasieve operatie, herstelt het dier snel en volledig. Ondanks het invasieve karakter van onze procedure, ervaren wij een maximale post-chirurgische mortaliteit van 2 – 5 % afhankelijk van de ervaring van de chirurg, genetische achtergrond van het dier en de aseptiek van de chirurgische omgeving. Vervolgens includeren wij een correctie als gevolg van mortaliteit van max. 15% als gevolg van mortaliteit ten gevolge van plotse dood geassocieerd met latere fases van hartfaal ontwikkeling (> 4 weken post-chirurgie). De mortaliteit cijfers samen (vroeg, post-chirurgische mortaliteit en late mortaliteit als gevolg van chronische ziekte geven de aangegeven mortaliteit van 20%).

Het klinisch verloop in de muis van hartfalen na stenale transverse aorta constrictie behelst vervolgens een myocardiale, adaptieve fase van ± 2 weken na chirurgie, waarbij de wanden van de linker ventrikel langzaam dikker worden, maar waarbij de hemodynamische en contractiele functie van het hart gelijk blijft (gelijkblijvende cardiac output). ± 2 weken na chirurgie ontwikkelt gradueel een fase van decompensatie, waarbij de linker ventrikel minder kracht kan uitoefenen, welke duidelijk meetbaar is via echo of invasieve technieken ± 4 weken na chirurgie. ± 4 weken tot ± 12 weken na chirurgie doorloopt het dier gradueel een fase van een mildere vorm tot een ernstigere vorm van hartfalen, welke gepaard gaat met steeds duidelijkere klinische gedragskarakteristieken van hartfalen met primaire klinische eindpunten zoals verminderde activiteit, verminderde eetlust, dispnoea, bemoeilijkte ademhaling en plotse mortaliteit. Deze fases komen overeen met het klinisch verloop van patiënten in eindstadia (NYHA klassen III-IV) van hartfalen, wat wederom de waarde van dit experimentele model aantoont.

Concluderend: onze procedure van TAC operatie bootst het chronische karakter van hartfalen na, niet die van acuut hartfalen.

Vraag 3c: "De DEC vraagt zich verder af waarom de TAC operatie nog steeds uitgevoerd wordt met de meest belastende methode voor de dieren (doorknippen sternum)."

Antwoord 3c: Hier is bewust gekozen voor een model met een lage mortaliteit van 2 – 5% bij een sternale benadering van transverse aorta constrictie, tegen een model met hoge mortaliteit van 20 – 50 % (landelijke gegevens¹) door benadering van transverse aorta constrictie via de ribben (intercostaal). Extrapolerend van humane gegevens is het daarnaast misschien nog wel discutabel welke benadering (dmv doornemen van het sternum of intercostaal, vergelijkbaar met een ernstige

¹ Zie bijlagen.

kneuzing van de ribben) het meeste ongerief oplevert. Op grond van de tot nu toe bruikbare parameters voor ongerief in muizen blijkt niet in onze proeven, dat een benadering via het sternum pijnlijker zou zijn, dan een intercostale benadering. Daarom wordt op basis van overleving bewust gekozen voor een benadering via het sternum.

Vraag 3d: *"De DEC wil graag weten of er geen controle groep nodig is (met en/of zonder anesthesie)."*

Antwoord 3d: Zie ook ons antwoord op vraag 3a. Vóór het uitvoeren van de TAC operatie wordt er een controle (basaal) gedragsmeting gedaan. Door het postoperatieve gedrag van de sham groep met zijn eigen baseline te vergelijken kunnen we het effect van anesthesie/operatie bestuderen. Op basis van ervaring met (stereotactische) operaties van de I, weten we dat het effect van een anesthesie/operatie te verwaarlozen is.

Vraag 3e: *"De DEC is van mening, dat als al uit de vergelijking tussen de sham en controle groep zal blijken dat de invloed van de anesthesie en de operatie te groot is, op voorhand blijkt dat dit model niet geschikt is. Dit zou kunnen leiden tot een andere keuze voor het opwekken van hartfalen. Gaarne uw commentaar hierop."*

Antwoord 3e: Zoals hierboven uitgebreid becommentarieerd, voorzien wij op basis van uitgebreide ervaring op het gebied van zowel (stereotactische) operaties van de I, als de uitgebreide operatieve ervaring op het gebied van het opwekken van een chronisch model van hartfalen van de en door de keuze van de anesthesie (isofluraan met aanvullende pijnbestrijding), geen invloed van de acute aspecten van anesthesie en operatie op de wetenschappelijke vraagstelling van deze aanvraag. Zoals hierboven is verder betoogt, bestaat er, naar ons inziens, geen beter wetenschappelijk model van hartfalen voor de centrale vraagstelling van deze project aanvraag.

Met vriendelijke groet,

Bijlage 1

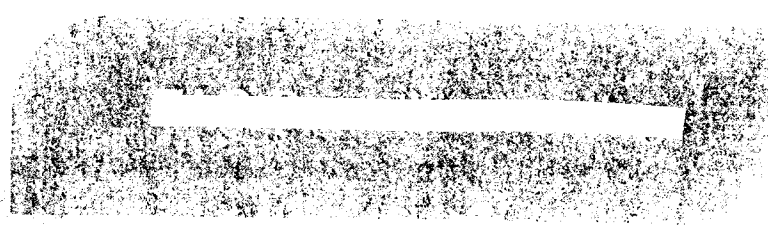
..., is door het veld zelf een
waarbij ervaringen werden gedeeld wat betreft de verschillende TAC operatie
technieken en wetenschappelijke resultaten zoals verkregen aan de verschillende
(o.a. Amsterdam, Rotterdam, Maastricht, Groningen, Utrecht).
Aanwezig waren (art. 12
functionarissen), proefdierdeskundigen van de centra, en enkele onderzoeksleiders.
Tijdens de meeting werden grote verschillen geconstateerd in ervaren mortaliteit en
wetenschappelijk resultaat. De sternale benadering van TAC in de muis bleek hierin
geassocieerd met de laagste mortaliteit (2-5%) en het beste wetenschappelijke
resultaat (uitgedrukt als uiteindelijke hartspiervergroting en nabootsen van klinisch
verloop hartfalen). In bijna alle centra leek de ervaringsdeskundigheid van betrokken
art. 12 functionarissen voldoende te zijn. In ons geval hebben wij additioneel
geïnvesteed om de betrokken art. 12 functionaris additionele training te geven in
algemene micro-chirurgische technieken en deze specifieke methode van transverse
aorta constrictie (zie certificering art. 12 functionaris van deze projectaanvraag als
bijlage 3).

Bijlage 2

I

Bijlage 3

Certificaat art. 12 functionaris betrokken bij microchirurgische techniek van deze
projectaanvraag.



The aim of this scientific meeting is to discuss the protocol design for TAC surgery with a focus on peri-operative care and surgical technique. This scientific meeting shall serve study directors and technicians in the field of cardiac diseases.

Participants already performing the surgery will present their protocol, the survival of the animals and the morbidity of the animals after surgery in the morning session.

In the afternoon session there will be discussions about used techniques and the proper peri-operative care and treatment.

We hope that this scientific meeting will be the starting point towards consensus for a TAC protocol with a strong focus on survival. Feedback from participants after the meeting is very welcome and will contribute to the topics selected for further meetings based on surgically altered models.

The meeting is sponsored by

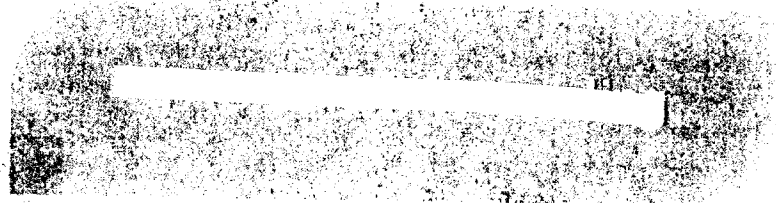
Details of the location will be send by e-mail separately.

On the second page you can find the program. To register, please use the separate registration form!

Organizing Committee:

Maastricht University

, *Animal Welfare Officer, I*



WE ARE PLEASED TO PRESENT THE FOLLOWING PROGRAM:

- | | |
|---------------|---|
| 10:00 - 10:15 | Welcome & Introduction of participants |
| 10:15 - 12:30 | Presentations by participants (15-20 minutes/presentation)
Model: used technique, peri-operative care, morbidity, mortality, discomfort, data, etc. |
| 12:30 - 13:30 | Lunch |
| 13:30 - 13:45 | Summary of talks by !, Maastricht University & |
| 13:45 - 15:30 | Discussions;
- anesthesia
- peri-operative care (and analgesia)
- technique of surgery
- post operative care
- and suchlike |
| 15:30 - | Summary, closure of meeting followed by a small get-together |

Certificate of Completion

This is to certify that

has attended and successfully completed the

Dedicated course: TAC surgery
and theory of perioperative care & aseptical surgery techniques

Successful practised
Transverse Aorta Constriction in mice
under aseptic conditions

. the Netherlands.

Animal Welfare Officer

Supervisor Surgical Unit

Aan

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
28-06-2011

Project: *Cognitive Function in mice during the development of heart failure.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

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: 2011-060
Diersoort: muis
Aantal dieren: 27
Einddatum: 24-06-2015

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