

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC-UM

Versie 2006

Herziene versie**DECNR: 2011-055****Ontvangen: 16-08-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
18-08-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot (WIJZIGING)		

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

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

Financieel beheerder		Budgetnummer	30982255B
----------------------	--	--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity.startdatum 01/05/2011 einddatum 01/05/2012⁹ Duur van de proef¹⁰: 17d

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. (VM) GGO ⁷	n/a		
4. Overige uitvoerenden		Art. 9	
5. Overige Uitvoeren		Art 12	
6. Overige Uitvoeren		Wetenschappelijk beoordelaar/vakgroepvoorzitter	

Diergroep	1	2	3	4
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Ctrl/exp/sham	Sham with FA 0.4mg/g/day	Sham with FA 0.4mg/g/day + BH4 36mg/kg/d	Sham with Vit.C 0.04mg/g/day	Sham with Vit.C 0.04mg/g/day + BH4 36 mg/kg/d
Diersoort	Mice	Mice	Mice	Mice
Stam	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6
Construct / mutatie ?	No (WT)	No (WT)	No (WT)	No (WT)
Herkomst (leverancier) *				
Aantal	6	6	6	6
Geslacht	M	M	M	M
Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes	Yes	Yes
Leeftijd/gewicht	age 9-11wk, 21-24 g body wt	age 9-11wk, 21-24 g body wt	age 9-11wk, 21-24 g body wt	age 9-11wk, 21-24 g body wt
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 *	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	02	02	02	02
Mate ongerief *	03	03	03	03
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

Diergroep	5	6	7	8
	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Ctrl/exp/sham	Dox Tx with FA 0.4mg/g/day	Dox Tx with FA 0.4mg/g/day + BH4 36mg/kg/d	DoX Tx with Vit.C 0.04mg/g/day	Dox Tx with Vit.C 0.04mg/g/day + BH4 36 mg/kg/d
Diersoort	Mice	Mice	Mice	Mice
Stam	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6
Construct / mutatie ?	No (WT)	No (WT)	No (WT)	No (WT)
Herkomst (leverancier) *				
Aantal	10	10	10	10
Geslacht	M	M	M	M
Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes	Yes	Yes
Leeftijd/gewicht	age 9-11wk, 21-24 g body wt	age 9-11wk, 21-24 g body wt	age 9-11wk, 21-24 g body wt	age 9-11wk, 21-24 g body wt
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 *	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	02	02	02	02
Mate ongerief *	05	05	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

* VHL-coderingen zie bijlage

Verantwoording

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

Titel: Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity.

1. Doel van de proef

Doxorubicin-induced cardiotoxicity is a horrible side-effect of the use of the chemotherapeutic agent doxorubicin. Patients survive their cancer but can develop terminal heart failure.

This study is part of the and is following on DEC-2010-007. In DEC – 2010-007 we have demonstrated that modulating eNOS by adding folic acid 0.4mg/g/day significantly delays and reduces acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. In this study, we want to optimize the dose of the eNOS-modulation.

To continue the same terminology as in the toxicity in a 1 wk protocol

ACUTE-protocol refers to acute cardiac

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



- The use of doxorubicin as a highly efficacious anti-neoplastic agent in both adults and children has been hampered by acute cardiotoxicity and chronic ventricular dysfunction. I have preliminary evidence that NOS-dependent ROS has a pathogenetic role in doxorubicin-induced cardiotoxicity and that administration of the eNOS modulator folic acid can prevent doxorubicin-induced apoptosis and superoxide generation without affecting the anti-tumor effects of doxorubicin.
- This research is translational i.e. basic science with a direct and strong extrapolation towards the clinic. This research is extremely important to prevent and/or reverse doxorubicin-induced in e.g. patients with breast cancer or lymphoma or in children with pediatric tumors. These patients – when they survive their cancer – are at risk to develop a life-threatening form of heart failure, due to the cardiotoxic effects of doxorubicin.
- The proposed animal model of acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is the golden standard model and is already approved in DEC 2010-007

This project (including the animal model) has been extensively reviewed by the (3 independent reviewers) and even has There was complete consensus about the animal model, study design and numbers of animals.

3. Alternatieven

We are well-aware of the discomfort (anorexia -> death) that is caused by administration of doxorubicin to the mouse. However, in opposite to DEC 2010-007, this is only the acute-model, with significantly less anorexia. Doxorubicin-induced heart failure cannot be investigated in vitro. There is no human material available to explore, neither for the experimental neither for the control group.

4. Ethische afweging

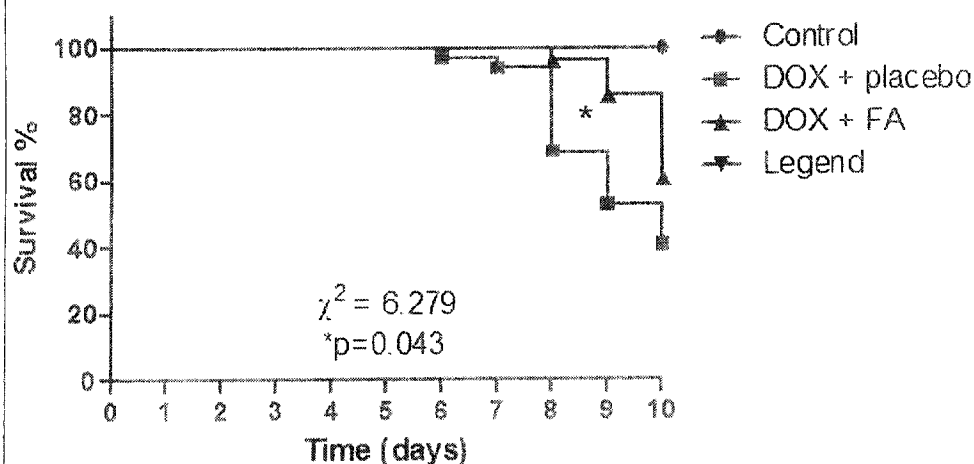
- Doxorubicin-induced heart failure is a very confronting reality in the clinic: Patients did survive their cancer, but did develop terminal heart failure. Very often this type of heart failure is diagnosed in women who were treated for breast cancer and in survivors of paediatric tumours.
- Very little is known about the pathogenetic mechanisms of this disease
- At this moment, only palliative/supportive treatment is possible, there is no curative treatment available.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Doxorubicin belongs to the group of the anthracyclines, which are antineoplastic drugs that are widely applied to treat a variety of solid tumors, breast carcinoma and hematological malignancies. Unfortunately, its use has been hampered by conventional toxicities and cardiotoxicity. Cardiotoxicity manifests in several forms, from supraventricular arrhythmia, nonspecific ST- changes and pericarditis to the more late-onset decompensated ventricular failure and sudden death. Beta-adrenergic blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors, which form the arsenal of heart failure treatment, have been useful in managing cardiac dysfunction resulting from anthracycline use. Of note, these agents have provided no success in the prevention or limiting of cardiac injury, but have only been beneficial for palliation. Although numerous mechanisms have been proposed, most studies support the view that an increase in oxidative stress, evidenced increases in the levels of ROS, and lipid peroxidation, along with reductions in the levels of antioxidants and sulfhydryl groups, play a key role in the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Recently, we and others have evidence of a pathogenetic role of NOS-dependent ROS-generation in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Furthermore, we have preliminary data suggesting that modulating eNOS by administration of folic acid significantly reduces superoxide-generation and apoptosis in an acute model of cardiotoxicity. Therefore, reducing superoxide generation, and more in detail, reducing eNOS-dependent superoxide generation by eNOS modulators can be considered to be effective in preventing, or even reversing, doxorubicin-induced ventricular dysfunction in oncology-patients.

In DEC 2010-007, we have demonstrated that the eNOS modulator folic acid 0.4mg/g/day can delay and reduce acute doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Survival curves DOX +/- FA



In this study, we will invest how we can optimize the dose of eNOS-modulation to obtain maximal effect on cardiotoxicity. We will do this by investing different dosage of folic acid, BH4 (another eNOS-modulator) and vit C (another eNOS-modulator) and their combination.



6. Wetenschappelijke beoordeling

- As described above, the whole project - including study design, animal models and number of animals - was reviewed by 3 independent reviewers of the Not any comment
was made and the whole project was awarded with This Committee has reviewed the scientific part of the
project, and as said, completely agreed on the study-protocol.

- In addition, a positive advise regarding the scientific necessity ('beoordeling en goedkeuring') of this project is given by the 'vakgroepvoorzitter', see attachment.

This protocol was never reviewed or rejected before by a DEC of another institution. The whole study is based on previously published methodology.

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species: mice.

Stam: c57bl6

Herkomst:

Herbegruijk: It is not possible to use previously used animals. Controle animals (from DEC 2010-007) will be used as baseline in follow-up studies.

7b. Sexe

Male: Because estrogen has a cardioprotective affect in heart failure models. The results will not be reliable and can interfere with each other. We do realise that doxorubicin-induced cardiotoxicity is a frequent problem in female patients (with breast cancer who receive doxorubicin as their anti-tumour drug). We are also very interested in the gender difference regarding doxo-induced cardiotoxicity and its relation with eNOS-uncoupling, and will investigate this in a separate project, together with the centre for gender medicine (Charite university, Berlin).

7.c. Aantallen

Please see paragraph 8 for more details.

Voor eNOS uncoupling (read-out parameter) weten we uit gepubliceerde resultaten (Moens, Circulation 2008):

Delta = 0.25 en Sigma 0.15

Met de formule van L. Sachs: $n = 2(\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

Hierin $2(\alpha/2 - z\pi)^2 = F$. Voor een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0,05$ en een onderscheidingsvermogen (π) 80% is $F_{0,80} = 15,7$

Dus $n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2$

De spreiding (σ) wordt geschat op 0.15%. Het beoogde effect (δ) wordt geschat op 0.25%.

Dit geeft; $n = 15,7 * (0.15/0.25)^2 = 5.652$, Uitval wordt geschat op 0%

Indien uitval 40%: $(a-0,6a) = 5.652$ of $0.6a = 5.652$ of $5.652/0,6 = a$

Dus $a = 9.42 \rightarrow$ afgerond dus $n = 10$

Total n (for the whole project): 64

Group 1: WT - Sham with FA 0.4mg/g/day, n= 6 uitval 0% $\rightarrow$ totale n = 6

Group 2: WT- Sham with FA 0.4mg/g/day + BH4 36mg/kg/d , n= 6 uitval 0% $\rightarrow$ totale n = 6

Group 3: WT- Sham with Vit.C 0.04mg/g/day , n= 6 uitval 0% $\rightarrow$ totale n = 6

Group 4: WT - Sham with Vit.C 0.04mg/g/day + BH4 36 mg/kg/d , n= 6 uitval 0% $\rightarrow$ totale n = 6

Group 5: WT - Dox 10 days (acute) with FA 0.4mg/g/day, n= 6 uitval 40% (estimate) $\rightarrow$ totale n = 10

Group 6: WT - Dox 10 days (acute) with FA 0.4mg/g/day + BH4 36mg/kg/d , n= 6 uitval 40% (estimate) $\rightarrow$ totale n = 10

Group 7: WT - Dox 10 days (acute) with Vit.C 0.04mg/g/day, n= 6 uitval 40% (estimate) $\rightarrow$ totale n = 10

Group 8: WT - Dox 10 days (acute) with Vit.C 0.04mg/g/day + BH4 36 mg/kg/d , n= 6 uitval 40% (estimate) $\rightarrow$ totale n=10

This is a toxicity 'model' (with a well-described mortality/drop-out), hence this is not a toxicity 'study'. We are using the toxicity model as a model of a specific form of heart failure. In this form of heart failure, we are investigating the effect of eNOS-uncoupling with monomer/dimer-analysis as major endpoint and reading-parameter.

Important remark: The readingparameter is eNOS-uncoupling, because this whole scientific project is about doxo-induced eNOS-uncoupling and we want to investigate with this DEC the effect of modulating eNOS-uncoupling. The reading-parameter is NOT survival/mortality.

Drop-out: the drop-out of the placebo-group is 60% (see higher, point 5). This percentage came out of DEC 2010-007 and was similar to the drop-out% in the paper of Neilan et al.

We found a lower drop -out% with the high dose of folic acid (DEC 2010-007) i.e. 40%, and used this lower % in this new DEC. There is no realistic possibility to reduce toxicity-induced mortality. The only theoretical possibility is to reduce the dosis of dox, however then this drug will have less or no tumour cell-killing effect.

IN general, to reduce drop-out in this type of experiments, we use heating pads, iglo's and infra-red light to all animals.

Calculation of drop-out: The same drop-out % are used that we obtained in DEC 2010-007, i.e. for the folic acid group. There is no further possibility to further reduce the drop-out in the non-treated animals.

8. Experiment

Animals will be randomized. All functional and molecular analysis will be performed completely blinded.

Aantal groepen: Powercalculation see paragraph 7

Group 1: WT - Sham with FA 0.4mg/g/day, n= 6 uitval 0% -> totale n = 6

Group 2: WT- Sham with FA 0.4mg/g/day + BH4 36mg/kg/d , n= 6 uitval 0% -> totale n = 6

Group 3: WT- Sham with Vit.C 0.04mg/g/day , n= 6 uitval 0% -> totale n = 6

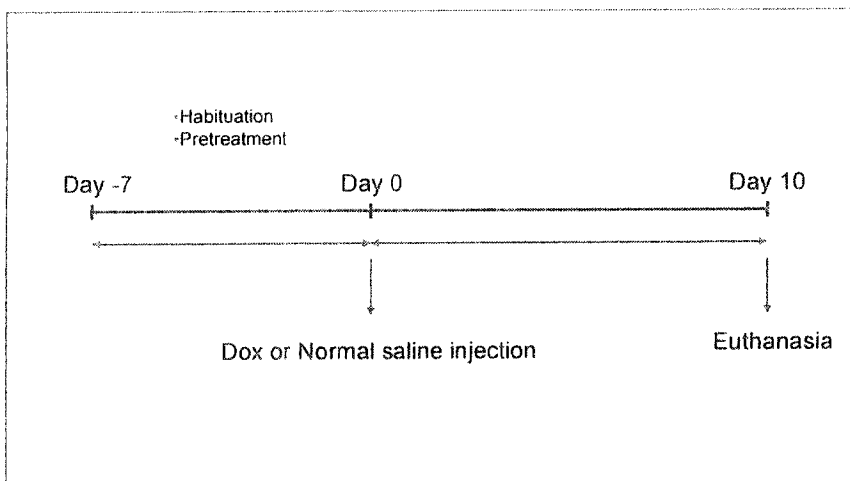
Group 4: WT - Sham with Vit.C 0.04mg/g/day + BH4 36 mg/kg/d , n= 6 uitval 0% -> totale n = 6

Group 5: WT - Dox 10 days (acute) with FA 0.4mg/g/day, n= 6 uitval 40% (estimate) -> totale n = 10

Group 6: WT - Dox 10 days (acute) with FA 0.4mg/g/day + BH4 36mg/kg/d , n= 6 uitval 40% (estimate) -> totale n = 10

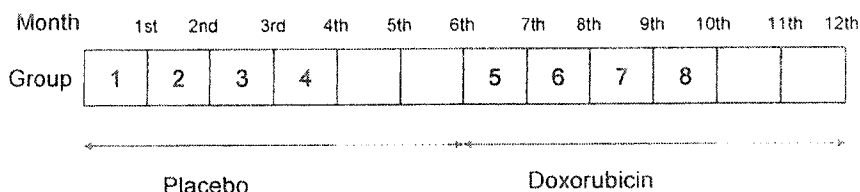
Group 7: WT - Dox 10 days (acute) with Vit.C 0.04mg/g/day, n= 6 uitval 40% (estimate) -> totale n = 10

Group 8: WT - Dox 10 days (acute) with Vit.C 0.04mg/g/day + BH4 36 mg/kg/d , n= 6 uitval 40% (estimate) -> totale n=10



Planning:

Groep 1-8: year 1 (05/2011-05/2012)



* the month will be counted following the approval date of the DEC protocol

**the duration of the experiment in each group will be 1-1.5 months, including the period of ordering animals, habituation and experiment (10days)

Important remark: due to my and others (Johns Hopkins University and Leuven University) experiences, administration of doxorubicin on a intravenous-way is creating a large variation in myocardial dysfunction.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Niet van toepassing/ Not applicable.

9b. Pijnbestrijding

Analgesia is not possible because it is interfering with the experiment: The use of NSAIDS (COX inhibitors) affects the suppression of the attending generation of superoxide anions and reduce a synergism with oxygen radicals produced by redox cycling of doxorubicin (DOX). Since this project is investigated the detrimental effect of DOX and oxidative stress in eNOS activity; therefore, we are not able to provide these drugs on our animal model. Moreover, studies showed that pretreatment with morphine (and other related molecules) also caused a dose-dependent increase in plasma doxorubicin. Importantly, morphine is able to protect DOX-induced cardiotoxicity(Kelishomi et al., 2008) hence, the use of this analgesic on DOX mice lead to the misinterpretation. This is discussed with the attending vet of our animal facilities.

Euthanasia will be performed if required (see 9c).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Analgesia is not possible because it is interfering with the experiment: The use of NSAIDS (COX inhibitors) affects the suppression of the attending generation of superoxide anions and reduce a synergism with oxygen radicals produced by redox cycling of doxorubicin (DOX). Since this project is investigated the detrimental effect of DOX and oxidative stress in eNOS activity; therefore, we are not able to provide these drugs on our animal model. Moreover, studies showed that pretreatment with morphine (and other related molecules) also caused a dose-dependent increase in plasma doxorubicin. Importantly, morphine is able to protect DOX-induced cardiotoxicity(Kelishomi et al., 2008) hence, the use of this analgesic on DOX mice lead to the

misinterpretation. This is discussed with the attending vet of our animal facilities. Euthanasia will be performed if required

Sacrifice of the animals will be achieved with an overdose of Isoflurane. In the case of the animals becoming unwell or sick during the time period of the procedures there will be consult with the veterinary surgeon and technical staff, to decide which treatment the animals should get, or if there is a humane endpoint such as:

Moribund state: measured by a lack of sustained purposeful response to gentle stimuli (example of purposeful response- weak attempt to get up; if animal is on its side, attempts should be asymmetrical in nature)

Weight loss: Animal whose bodyweight falls more than 30% below the initial weight of day 0 of the experiment (animals will be undergone food training for 7 days before the experiment)

weight loss $\leq$ 30% (i.e. 15, 20, 25, 30 %) intensively monitor
weight loss $>$ 30% sacrifice

Infection: infection involving any organ system (either overt, or indicated by increased body temperature or WBC parameters) which fails to respond to antibiotic therapy within an appropriate time and is accompanied by systemic signs of illness.

Respiratory: dyspnea, cyanosis.

Nervous: CNS depression, circular movement, seizures, paralysis of one or more extremities; pain unresponsive to analgesic therapy.

We mention pain code 03 , because this model (cardiotoxicity-model) is investigating the toxicity caused by doxorubicin.

" Criteria for euthanasia and evaluation: the moribund mice described below will be immediately euthanized, after contacting the researcher."

stage I, symptomatic mice are hypoactive but retains a normal posture and gait. These mice have minimal grooming activity and interaction with other mice.

stage II, there is an increase in spontaneous motor activity, which is characterized by a wobbly gait (ataxia), tremors, and a frequency to fall to one side with short episodes of paddling.

stage III is characterized by a reduction in motor hyperactivity with ventral or lateral recumbency (moribund state) and frequently bilateral hindlimb extension (more pronounced in protocol 2). Occasionally mice would have a seizure when arouse

Zorg

10a. Ongerief



Sham experiment : normal saline i/p 0.01 ml/g body weight (calculated by using the similar volume of DOX i/p injection 20mg/kg (i.e 0.01 ml/g BW)

-> total amount of discomfort: Code 3

	Discomfort	Freq	Duration
Injection (ip):	Code 3	1x	1-5sec

Euthanasia:	Code 2	1x	3 min
<i>Effect of doxorubicin</i>	<i>n/a (sham)</i>	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>

Acute experiments with doxo:

	Discomfort	Freq	Duration
Injection (ip):	Code 3	1x	1-5sec
Consequences of injection:	Code 5	1x	Variable (no estimation possible)
Euthanasia:	Code 2	1x	3 min
<i>Effect of doxorubicin</i>	<i>Code 5</i>	<i>1x</i>	<i>10d</i>

-> total ongerief for doxo acute : code 5

Death and exaggerated weight loss are very serious side effects of doxorubicin. Due to the lack of treatment for doxorubicin-induced heart failure, these experiments are very essential.

This is a 10d-model of acute cardiotoxicity. There are several other types of dox-induced cardiotoxicity (e.g. subacute and chron), but they are not investigated in this particular project.

10b. Welzijnsevaluatie

The humane endpoints ,welfare evaluation and discomfort scoring sheets have been adjusted according to the meeting between the researchers and the animal welfare officer of CPV, , on 8 December 2010.
We will complete 'scoringlists' and will fulfill intensive controles during the experiments.

11. Verzorging en huisvesting

Protection against doxorubicin-metabolites in the secretary system.

Housing : cfr MUMC-doxo guidelines. Animals will be housed in groups of 2-3 animals/cage. Water and food ad libidum with cage enrichment in DMIL.

Contact-person:

12. Deskundigheid

13. Standard Operation Procedures (SOP)

In sham, animals will be injected (i/p) with normal saline.

In doxorubicin group, animals will be injected (i/p) doxorubicin 20 mg/kg

Doxorubicin will be dissolved in NaCl 0.9%.

At the end of the experiment (after 10d for the acute protocol) the animals will be placed under isoflurane anaesthesia and then an overdose of isoflurane will be given by a gas-chamber.

Relevante literatuur

See attachment (Neilan et al.)



voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Maastricht, 4 juli 2011



Betreft: Projectnummer 2011-055

Directeur

Geachte

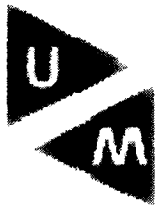
Hierbij bevestig ik, dat het project met
projectnummer 2011-055

*"Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the
prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity"*

wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is.

In de hoop u voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,



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, 03-05-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity*", is op de DEC vergadering van 29 april 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * De DEC merkt op, dat gezien het aantal dieren, dit geen pilot is en verzoekt dit op het voorblad bij "type aanvraag" aan te passen.
- * Op het voorblad wordt bij pijnbestrijding code 03 vermeld. Dit wil zeggen dat het toepassen van analgesie praktisch onuitvoerbaar is. De DEC wenst de motivering hiervoor en verzoekt dit te vermelden bij punt 9b.
- * De DEC merkt op dat de shamgroepen 1 t/m 4 minder ongerief hebben. De DEC verzoekt dit aan te passen, dit moet in overeenstemming zijn met punt 10a.
- * Het attachment waar bij punt 4 over geschreven wordt, ontbreekt.
- * De laatste regels van punt 2 en punt 4 staan ook nog bij punt 6 vermeldt. De DEC merkt op dat 1x vermelden voldoende is.
- * De DEC verzoekt de vakgroepvoorzitter als PI op het voorblad te vermelden. De wetenschappelijke beoordeling is onvolledig en niet voldoende (The scientific necessity is niet het enige criteria). De DEC verzoekt aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd.
- * Bij punt 7c verzoekt de DEC aan te geven wat de reden is van de uitval en wat er ondernomen wordt om de uitval te reduceren. De DEC vraagt zich af of er geen verschil van uitval is tussen de controle en experimentele groepen? Tevens merkt de DEC op dat de berekening van de uitval niet correct is. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- * De alinea over de uitleesparameter bij punt 7c is niet juist. In dit experiment lijkt de uitleesparameter "overleving" en niet "eNOS blot". De DEC acht dit niet acceptabel omdat de dood geen uitleesparameter kan zijn, noch een humaan eindpunt.
- * De DEC wil graag de motivering waarom doxorubicine niet i.v. geïnjecteerd kan worden. De DEC is van mening dat i.v. minder ongerief veroorzaakt en merkt op dat dit in het verleden binnen de UM eerder werd toegepast.
- * De DEC verzoekt bij punt 9c het gewichtsverlies aan te passen in $\leq 30\%$.

- De DEC vraagt zich af of het niet mogelijk is het humaan eindpunt iets te vervroegen (moribund state).
- De DEC verzoekt een scoringslijst bij te houden en intensieve controles te houden tijdens het experiment.
- De DEC verzoekt bij punt 10a het ongerief van de sham en dox groepen apart vermelden. Tevens verzoekt de DEC het ongerief ten gevolge van de toediening van de genoemde inhibitor ook te vermelden en de consequentie van de injectie aan te passen in maximaal 10 dagen (de DEC verzoekt in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie aan te geven per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven).

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 2011-055, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Response to questions from DEC regarding protocol DEC 2011-055

Question 1: De DEC merkt op, dat gezien het aantal dieren, dit geen pilot is en verzoekt dit op het voorblad bij "type aanvraag" aan te passen.

Response 1: Apologies for this typo, we have corrected this accordingly to "new DEC protocol".

Question 2: Op het voorblad wordt bij pijnbestrijding code 03 vermeld. Dit wil zeggen dat het toepassen van analgesie praktisch onuitvoerbaar is. De DEC wenst de motivering hiervoor en verzoekt dit te vermelden bij punt 9b.

Response 2: Niet van toepassing/ Not applicable, because practical not possible, Euthanasia will be performed if required (see 9c). We mention pain code 03 , because this model (cardiotoxicity-model) is investigating the toxicity caused by doxorubicin. In addition, the use of NSAIDS (COX inhibitors) affects the suppression of the attending generation of superoxide anions and reduce a synergism with oxygen radicals produced by redox cycling of doxorubicin (DOX). Since this project is investigated the detrimental effect of DOX and oxidative stress in eNOS activity; therefore, we are not able to provide these drugs on our animal model. Moreover, studies showed that Morphine pretreatment also caused a dose-dependent increase in plasma doxorubicin. Importantly, morphine is able to protect DOX-induced cardiotoxicity(Kelishomi *et al.*, 2008) hence, the use of this analgesic on DOX mice lead to the misinterpretation.

Question 3: De DEC merkt op dat de shamgroepen 1 t/m 4 minder ongerief hebben. De DEC verzoekt dit aan te passen, dit moet in overeenstemming zijn met punt 10a.

Formatted: Bullets and Numbering

Response 3: We have corrected 10a according to the DEC suggestion. We have added:

*Sham experiment : normal saline i/p 0.01 ml/g body weight (calculated by using the similar volume of DOX i/p injection 20mg/kg (i.e 0.01 ml/g BW)
-> total amount of discomfort: Code 3*

	<i>Discomfort</i>	<i>Freq</i>	<i>Duration</i>
<i>Injection (ip):</i>	<i>Code 3</i>	<i>1x</i>	<i>1-5sec</i>
<i>Consequences of injection: possible)</i>	<i>Code 1</i>	<i>1x</i>	<i>Variable (no estimation</i>
<i>Euthanasia:</i>	<i>Code 2</i>	<i>1x</i>	<i>3 min</i>

Question 4: Het attachment waar bij punt 4 over geschreven wordt, ontbreekt.

Formatted: Bullets and Numbering

Response : The attachment (with the statement of the "vakgroepvoorzitter) was handed to your administration office on May and afterwards confirmed by email. (In the future we will scan everything).

Question 5: De laatste regels van punt 2 en punt 4 staan ook nog bij punt 6 vermeldt. De DEC merkt op dat ~~ix~~ vermelden voldoende is.

Formatted: Bullets and Numbering

Response : We deleted the bottom 3 paragraphs in point 4 according to the DEC recommend.

Question 6: De DEC verzoekt de vakgroepvoorzitter als PI op het voorblad te vermelden. De wetenschappelijke beoordeling is onvolledig en niet voldoende (The scientific necessity is niet het enige criteria). De DEC verzoekt aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd.

Response : I think there is some confusion. The scientific judgement of this project was done by both , after resp. international and national review-procedures. The ' ' has no active and/or practical role in this project.

Question 7: Bij punt 7c verzoekt de DEC aan te geven wat de reden is van de uitval en wat er ondernomen wordt om de uitval te reduceren. De DEC vraagt zich af of er geen verschil van uitval is tussen de controle en experimentele groepen? Tevens merkt de DEC op dat de berekening van de uitval niet correct is. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Response : Thank you for pointing this out. The well-described reason of acute mortality after DOX administration is acute cardiotoxicity. Acute (and chronic) cardiotoxicity are als well-described lethal consequences of dox-administration in the clinic (e.g. to women with breast cancer or to children with pediatric tumours). Unfortunately, no clear treatment for this is available in the clinic, and also not in mice. The only way - at the moment - to reduce cardiac toxicity is to reduce the dosis of DOX, however than it has less cell-killing effect (and will the patient die from his cancer).

We do expect a lower mortality in the treatment group. However, it is impossible to make any suggestion on this percentage. We think that our estimation (so not a calculation - which is not possible) from 40% mortality after dox + drug (vs. 60% mortality after dox + placebo) is realistic.

We have added to the drop-out calculation 7c: "There is no realistic possibility to reduce toxicity-induced mortality. The only theoretical possibility is to reduce the dosis of dox, however then this drug will have less or no tumour cell-killing effect."

Question 8: De alinea over de uitleesparameter bij punt 7c is niet juist. In dit experiment lijkt de uitleesparameter "overleving" en niet "eNOS blo!". De DEC acht dit niet acceptabel omdat de dood geen uitleesparameter kan zijn, noch een humaan eindpunt.

Response: We do understand that this raises some questions. Indeed, this is a toxicity 'model' (with a well-described mortality/drop-out), hence this is not a toxicity 'study'. We are using the toxicity model as a model of a specific form of heart failure. In this form of heart failure, we are investigating the effect of eNOS-uncoupling with monomer/dimer-analysis as major endpoint and reading-parameter. We have added this point 7c reading parameter.

Question 9: De DEC wil graag de motivering waarom doxorubicine niet i.v. geïnjecteerd kan worden. De DEC is van mening dat i.v. minder ongerief veroorzaakt en merkt op dat dit in het verleden binnen de UMF eerder werd toegepast.

Formatted: Bullets and Numbering

Formatted: Bullets and Numbering

Response : From my own and others (Johns Hopkins University and Catholic university Leuven) IV-injections create too much variance in the cardiotoxicity-model, and therefore not useful to reduce the amount of animals needed for the experiment. In addition, to utilize the different research parameters and methods of producing DOX induced cardiotoxicity in a mouse model, we reproduce the route of drug administration from our reference (Neilan *et al.*, 2007)

Question 10: De DEC verzoekt bij punt 9c het gewichtsverlies aan te passen in $\leq 30\%$.

Formatted: Bullets and Numbering

Response : We have corrected 9c according to the DEC suggestion.

Weight loss: Animal whose bodyweight falls more than 30% below the initial weight of day 0 of the experiment (animals will be undergone food training for 7 days before the experiment)

weight loss $\leq 30\%$ (i.e. 15, 20, 25, 30 %) intensively monitor

weight loss $> 30\%$ sacrifice

Question 11: De DEC vraagt zich af of het niet mogelijk is het humane eindpunt iets te vervroegen (moribund state).

Formatted: Bullets and Numbering

Response : This humane endpoints has been adjusted according to the DEC 2010-007. In addition, the details of the humane endpoints has been screened by the animal welfare officer of CPV, on 8 December 2010

" Criteria for euthanasia and evaluation: the moribund mice described below will be immediately euthanized, after contacting the researcher."

stage I, symptomatic mice are hypoactive but retains a normal posture and gait.

These mice have minimal grooming activity and interaction with other mice.

stage II, there is an increase in spontaneous motor activity, which is characterized by a wobbly gait (ataxia), tremors, and a frequency to fall to one side with short episodes of paddling.

stage III is characterized by a reduction in motor hyperactivity with ventral or lateral recumbency (moribund state) and frequently bilateral hindlimb extension (more pronounced in protocol 2). Occasionally mice would have a seizure when arouse

We have added this additional criteria in 9c

Question 12: De DEC verzoekt een scoringslijst bij te houden en intensieve controles te houden tijdens het experiment.

Formatted: Bullets and Numbering

Response 12 : We will keep the discomfort scoring sheet according to the DEC suggestion.

Question 13: De DEC verzoekt bij punt 10a het ongerief van de sham en dox groepen apart vermelden. Tevens verzoekt de DEC het ongerief ten gevolge van de toediening van de genoemde inhibitor ook te vermelden en de consequentie van de injectie aan te passen in maximaal 10 dagen (de DEC verzoekt in een

Formatted: Bullets and Numbering

tabel, de aard, ernst, duur en frequentie aan te geven per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven).

Response 13 : We have added a new discomfort assesment for sham experiment seperately in 10a according to the DEC suggestion (see response 3).

References

Kelishomi, RB, Ejtemaeemehr, S, Tavangar, SM, Rahimian, R, Mobarakeh, JI, Dehpour, AR (2008) Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology* 243(1-2): 96-104.

Neilan, TG, Blake, SL, Ichinose, F, Raher, MJ, Buys, ES, Jassal, DS, Furutani, E, Perez-Sanz, TM, Graveline, A, Janssens, SP, Picard, MH, Scherrer-Crosbie, M, Bloch, KD (2007) Disruption of Nitric Oxide Synthase 3 Protects Against the Cardiac Injury, Dysfunction, and Mortality Induced by Doxorubicin. *Circulation* 116(5): 506-514.



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, 04-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity*", is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

De DEC merkt op, dat de onderstaande vragen, al eerder gesteld door de DEC in zijn vergadering van 29-04-2011, nog niet bevredigend zijn beantwoord en verzoekt dit alsnog te doen:

- * Punt 6- De DEC verzoekt de vakgroepvoorzitter als PI op het voorblad te vermelden De wetenschappelijke beoordeling is onvolledig en niet voldoende (The scientific necessity is niet het enige criteria). De DEC verzoekt aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd. Het attachment ontbreekt.
- * Bij punt 7c- De DEC merkt op dat de berekening van de uitval niet correct is. De DEC verzoekt dit aan te passen.
- * De alinea over de uitleesparameter bij punt 7c is niet juist. In dit experiment lijkt de uitleesparameter "overleving" en niet "eNOS blot". De DEC acht dit niet acceptabel omdat de dood geen uitleesparameter kan zijn, noch een humaan eindpunt.
- * De DEC wil graag de motivering waarom doxorubicine niet i.v. geïnjecteerd kan worden. De DEC is van mening dat i.v. minder ongerief veroorzaakt en merkt op dat dit in het verleden binnen de UM eerder werd toegepast.
- * De DEC vraagt zich af of het niet mogelijk is het humaan eindpunt iets te vervroegen (moribund state).
- * De DEC verzoekt een scoringslijst bij te houden en intensieve controles te houden tijdens het experiment.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

In verband met de redelijk late reactie van de DEC-UM en het feit dat de vergadering van juli 2 weken eerder is dan gepland, stellen wij u in de gelegenheid om uw herziene versie uiterlijk donderdag 7 juli in te leveren, zodat deze nog op de agenda geplaatst kan worden voor de vergadering van 15 juli aanstaande.

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 2011-055, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Vraag 1: Punt 6- De DEC verzoekt de vakgroepvoorzitter als PI op het voorblad te vermelden. De wetenschappelijke beoordeling is onvolledig en niet voldoende (The scientific necessity is niet het enige criteria). De DEC verzoekt aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd. Het attachment ontbreekt.

Antwoord 1: Vermeld als *Scientific Necessity* op de voorpagina. De bijlage is nu digitaal toegevoegd.

Vraag 2: Bij punt 7c- De DEC merkt op dat de berekening van de uitval niet correct is. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Antwoord 2: Excuses voor deze rekenfout. Om een uiteindelijke groepsgrootte te bekomen van n=6 met een dropout van 40% is de oorspronkelijke groepsgrootte 10 (en niet zoals eerder berekend 9). We hebben dit aantal gecorrigeerd op voorblad en aanvraag.

Vraag 3: De alinea over de uitleesparameter bij punt 7c is niet juist. In dit experiment lijkt de uitleesparameter "overleving" en niet "eNOS blot". De DEC acht dit niet acceptabel omdat de dood geen uitleesparameter kan zijn, noch een humaan eindpunt.

Antwoord 3: Voor alle duidelijkheid vermelden we hier dat overleving nooit een uitleesparameter is geweest en dit nooit zal zijn. Dit model, net zoals zijn evenbeeld in de kliniek, heeft een grote mortaliteit, Dit neemt niet weg dat de uitleesparameter eNOS uncoupling is. We hebben dit nogmaals geaccentueerd in punt 7c.

Vraag 4: De DEC wil graag de motivering waarom doxorubicine niet i.v. geïnjecteerd kan worden. De DEC is van mening dat i.v. minder ongerief veroorzaakt en merkt op dat dit in het verleden binnen de UM eerder werd toegepast.

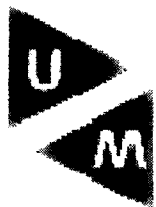
Antwoord 4: Het is mijn ervaring (ten tijde van Johns Hopkins-USA, Baltimore) en ook die van de Universiteit van Leuven dat dit protocol waarin doxo IV wordt toegediend een groter variatie geeft op vlak van myocardial dysfunctie (vermoedelijk is dit uptake-gerelateerd) Omdat myocardial dysfunctie net een belangrijke component is van deze proef, kunnen wij dit niet toepassen. We hebben dit verduidelijkt in de DEC-aanvraag. We zullen de literatuur hieromtrent strikt opvolgen, en eventuele voorstellen tot protocol wijzigingen aan de DEC voorleggen.

Vraag 5: De DEC vraagt zich af of het niet mogelijk is het humaan eindpunt iets te vervroegen (moribund state).

Antwoord 5: Het humane eindpunt is de moribund state. Dit was reeds vermeld in de aanvraag. Dit is nu meer zichtbaar gemaakt.

Vraag 6: De DEC verzoekt een scoringslijst bij te houden en intensieve controles te houden tijdens het experiment.

Antwoord 6: Wij zullen een scoringslijst bijhouden en intensieve controles houden tijdens het experiment. Dit is nu vermeld in de aanvraag.



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: MQ-402-11

Maastricht, 19-02-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie van uw projectaanvraag: "*Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity*", is op de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 7c de onderbouwing van de aantallen in overeenstemming te brengen met de andere protocollen (berekening volgens statistiek met delta en sigma) en de uitval te berekenen over de niet afgeronde aantallen.
- De DEC verzoekt bij punt 10a het effect van doxorubicine (code 05) te vermelden in de tabel.

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 2011-055, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



Antwoorden betreffende DEC 2011-055:

Uw vraag betreffende statistische onderbouwing aan te passen zoals in de andere projecten en de uitval te berekenen op de afgeronde getallen:

Dit werd aangepast in punt 7c

Uw vraag betreffende vermelding score 5 voor gevolgen doxo-injectie

Score 5 werd in tabel aangevuld.

Uw bemerking betreffende

Dit werd verwijderd

Vriendelijke groeten

From:
Sent: woensdag 27 juli 2011 14:28
To:
Subject: FW: aangepaste versie dec 2011-055 en 056
Attachments: 2011-055__Aanvraag_dierproef_DEC-UM_20110719FINAL3.rtf

Geachte Onderzoeker,

De DEC heeft wederom je herziene versie besproken van protocol 2011-055.

De DEC heeft in zijn brief van 19-07-2011 onder andere de volgende vraag gesteld:

- De DEC verzoekt bij punt 10a het effect van doxorubicine (code 05) te vermelden in de tabel.

Deze vraag is niet goed beantwoord.

Bij punt 10a verzoekt de DEC aan te geven dat het ongerief ten gevolge van de doxorubicin injectie maximaal 10 dagen (duration) aanhoudt (in plaats van variable).

De shamgroepen krijgen saline toegediend. In deze groepen is dus geen effect van doxorubicin te verwachten. De DEC verzoekt dit aan te passen bij punt 10a en het ongerief op het voorblad in overeenstemming te brengen.

Ik zie de herziene versie, graag met voorblad, wel weer verschijnen.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

5

Postbus 616
T 043
E-mail:

1, 6200 MD Maastricht

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

From:
Sent: donderdag 21 juli 2011 10:13
To:
Subject: aangepaste versie dec 2011-055 en 056

Beste

In bijlage de aangepaste versies van de 2 eerste DEC's. De andere zullen aangepast zijn tegen de deadline in augustus.

Groetjes

From:
Sent: maandag 8 augustus 2011 12:02
To:
Subject: FW: DEC 2011-055 herziene versie
Attachments: 2011-055__Aanvraag_dierproef_DEC-UM_20110728FINAL.rtf; Antwoorden betreffende DEC 2011 055 edited 20110728.doc; 2011-055_front_page_20110728.rtf

Geachte onderzoeker

De DEC heeft de herziene versie wederom bekeken en heeft nog de volgende opmerking, deze werd reeds eerder gemaakt, maar nog niet goed aangepast:

- Pijnstilling code 03 op het voorblad: verplicht aangeven en onderbouwen onder 9c waarom het niet praktisch uitvoerbaar is!

Graag je reactie.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM

Ambtelijk secretaris

Postbus 616 6200 MD Maastricht t 043 388 1108
E-mail:

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

From:
Sent: donderdag 28 juli 2011 9:32
To:
Subject: FW: DEC 2011-055 (wijziging)

Goedemorgen

Namens An zend ik je bijgaand de gewijzigde DEC aanvraag 2011-055

mochten er nog aanpassingen nodig zijn dan hoor ik het graag

Groetjes,

voorblad: sham is aangepast
aanvraag: duration 10 is aangepast

Response to your email dd august 8th, regarding dec 2011-055

Question : Pijnstilling code 03 op het voorblad: verplicht aangeven en onderbouwen onder 9c waarom het niet praktisch uitvoerbaar is!

Response:

Analgesia is not possible because it is interfering with the experiment. We have edited the code towards 02, after we have discussed this with dr. Barry Plooyer. The use of NSAIDS (COX inhibitors) affects the suppression of the attending generation of superoxide anions and reduce a synergism with oxygen radicals produced by redox cycling of doxorubicin (DOX). Since this project is investigated the detrimental effect of DOX and oxidative stress in eNOS activity; therefore, we are not able to provide these drugs on our animal model. Moreover, studies showed that pretreatment with morphine (and other related molecules) also caused a dose-dependent increase in plasma doxorubicin. Importantly, morphine is able to protect DOX-induced cardiotoxicity(Kelishomi et al., 2008) hence, the use of this analgesic on DOX mice lead to the misinterpretation. This is discussed with the attending vet of our animal facilities. Euthanasia will be performed if required (see also 9c).

Aan:

Ons kenmerk *Doorkiesnummer* *Maastricht*
----- 043- 18-08-2011

Project: Determination of dose-response curve of eNOS modulators in the prevention of acute doxorubicin-induced acute cardiotoxicity.

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
11043

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-055

Diersoort: muis

Aantal dieren: 64

Einddatum: 18-08-2015

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

Vicavoorzitter DEC-UM