

## Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-080

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 05-09-2011

|                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| DEC datum goedkeuring# | Type aanvraag 2             |
| 07-09-2011             | Nieuw / Herz.versie / Pilot |

VROM/GGONR<sup>3</sup>LNV/CBDNR<sup>4</sup>

|              |       |        |                    |      |               |          |         |
|--------------|-------|--------|--------------------|------|---------------|----------|---------|
| 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:

"Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling"

startdatum

01/10/2011

einddatum<sup>9</sup>

01/04/2013

Duur van de proef<sup>10</sup>: De langste periode dat een dier in exp blijft is 11 wk (1 wk pretreatment + 10wk TAC).

|                                      | Naam | Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM) | E-mailadres | Bevoegdheid <sup>5</sup>                         | Cap. groep /afdeling |
|--------------------------------------|------|---------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------|----------------------|
| 1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO) |      |                                       |             | Art.9                                            |                      |
| 2. Vervanger VO (VVO)                |      |                                       |             | Art.9                                            |                      |
| 3. overige uitvoerenden              |      |                                       |             | Art 12                                           |                      |
| 4. Overige uitvoerenden              |      |                                       |             | Art.9                                            |                      |
| 5. Overige uitvoerenden              |      |                                       |             | Art 12                                           |                      |
| 5. Overige uitvoerenden              |      |                                       |             | Wetenschappelijk beoordeelaar/vakgroepvoorzitter |                      |

| Diergroep                | 1                           | 2                           | 3                           | 4                           | 5                           |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ctrl/exp/sham            | Exp (TAC)                   | Exp (TAC)                   | Exp (TAC)                   | Exp (TAC)                   | Exp (TAC)                   |
| Diersoort                | Mice                        | Mice                        | Mice                        | Mice                        | Mice                        |
| Stam                     | C57Bl/6                     | C57Bl/6                     | C57Bl/6                     | C57Bl/6                     | C57Bl/6                     |
| Construct / mutatie ?    | No (WT)                     | No (WT)                     | No (WT)                     | No (WT)                     | No (WT)                     |
| Herkomst (leverancier) * |                             |                             |                             |                             |                             |
| Aantal                   | 7                           | 7                           | 7                           | 7                           | 7                           |
| Geslacht                 | M                           | M                           | M                           | M                           | M                           |
| Dieren immuuncompetent ? | Yes                         | 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 | age 9-11wk, 21-24 g body wt |

|                           |    |    |    |    |    |
|---------------------------|----|----|----|----|----|
| Doel van de proef *       | 31 | 31 | 31 | 31 | 31 |
| Belang van de proef *     | 01 | 01 | 01 | 01 | 01 |
| Toxicologisch onderzoek * | 01 | 01 | 01 | 01 | 01 |
| Bijzondere technieken *   | 01 | 01 | 01 | 01 | 01 |
| Anesthesie *              | 04 | 04 | 04 | 04 | 04 |
| Pijnbestrijding *         | 04 | 04 | 04 | 04 | 04 |
| Mate ongerief *           | 05 | 05 | 05 | 05 | 05 |
| Toestand dier einde exp*  | 01 | 01 | 01 | 01 | 01 |

\* VHL-coderingen zie bijlage

| Diergroep                 | 6                                  | 7                                  | 8                                  | 9                                  | 10                                 | 11                                 |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ctrl/exp/sham             | Exp (TAC)                          | Exp (TAC)                          | Exp (TAC)                          | Exp (TAC)                          | Exp (TAC)                          | Exp (TAC)                          |
| Diersoort                 | Mice                               | Mice                               | Mice                               | Mice                               | Mice                               | Mice                               |
| Stam                      | C57Bl/6                            | C57Bl/6                            | C57Bl/6                            | C57Bl/6                            | C57Bl/6                            | C57Bl/6                            |
| Construct / mutatie ?     | No (WT)                            | No (WT)                            | No (WT)                            | No (WT)                            | No (WT)                            | No (WT)                            |
| Herkomst (leverancier) *  |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |
| Aantal                    | 7                                  | 7                                  | 7                                  | 7                                  | 7                                  | 7                                  |
| Geslacht                  | M                                  | M                                  | M                                  | M                                  | M                                  | M                                  |
| Dieren immuuncompetent ?  | Yes                                | Yes                                | Yes                                | Yes                                | Yes                                | Yes                                |
| Leeftijd/gewicht          | age 9-11 wk,<br>21-24 g<br>body wt | age 9-11 wk,<br>21-24 g body<br>wt | age 9-11 wk,<br>21-24 g body<br>wt | age 9-11 wk,<br>21-24 g body<br>wt | age 9-11 wk,<br>21-24 g body<br>wt | age 9-11 wk,<br>21-24 g body<br>wt |
| Doel van de proef *       | 31                                 | 31                                 | 31                                 | 31                                 | 31                                 | 31                                 |
| Belang van de proef *     | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 |
| Toxicologisch onderzoek * | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 |
| Bijzondere technieken *   | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 |
| Anesthesie *              | 04                                 | 04                                 | 04                                 | 04                                 | 04                                 | 04                                 |
| Pijnbestrijding *         | 04                                 | 04                                 | 04                                 | 04                                 | 04                                 | 04                                 |
| Mate ongerief *           | 05                                 | 05                                 | 05                                 | 05                                 | 05                                 | 05                                 |
| Toestand dier einde exp*  | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 | 01                                 |

# 1 Verantwoording

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

**Titel:** "Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling"

## 1. Doel van de proef.

- eNOS-dependent superoxide has an important role in the pathogenesis of pressure-overload induced ventricular remodeling and specific targeting of eNOS-dependent superoxide can even reverse pre-existing ventricular failure. Studies have shown the novel small molecule AVE3085, an eNOS transcription enhancer, which is designed to selectively upregulate eNOS transcription and enhance eNOS coupling (Wolfhart et al. 2008). AVE3085 has been showed to have had vasoprotective properties in experimental atherosclerosis (Wolfhart et al. 2008) and restore impaired endothelial function in a hypertensive model (Yang et al. 2011). However, the effect of AVE3085 on pressure-overload remodeling is unknown.
- **Endpoints/Objectives:** primary **endpoint:** Effect of different dosages of the eNOS-modulator AVE3085 on eNOS-uncoupling in different stages of heart failure (hypertrophy, dilation, decompensation) – used method: monomer/dimer visualisation  
**Sec endpoints:** Effect of different dosages of the eNOS-modulator AVE3085 on eNOS-uncoupling dependent superoxide generation (total and sources) in different stages of heart failure. -> used method: Lucigenin and DHE + addition of specific inhibitors ( all in vitro).
- To approach this research questions C57Bl6 mice (n= 77) will undergo moderate and severe TAC and receive AVE3085 (3, 30 and 300 mg/ kg body weight /day) from the beginning of the experiment or from week 5 (= onset of decompensated ventricular remodeling) until week 10 (= end-stage heart failure).
- At each time point, myocardium will be harvested for molecular analysis of eNOS-uncoupling, including the stoichiometric relation between BH4 and eNOS. Sources of superoxide will be analyzed using several inhibitors (such as apocynin, rotenon and CCCP) and western blotting for key molecules (such as Nox's) in the oxidative stress cascade.
- This study is based on a previous study of ( Circulation 2008) and of (JCI 2005), in which eNOS-uncoupling is described as a major player in the pathogenesis of pressure-overload induced heart failure. From then, visualization of eNOS monomer and dimers can be used as ' biomarker of oxidative stress', when tissue ( not plasma) is available.

## 2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Each hypothesis in this research project attacks the pathogenetic concept of eNOS-uncoupling from different yet highly complementary approaches. The scientific objectives are to advance basic understanding of novel mechanisms of eNOS regulation in situations of enhanced oxidative stress in both the myocardium, to reveal new pathways related to targeted protein signaling and to test therapeutic targets revealed by preclinical studies to benefit patients with myocardial dysfunction, i.e. heart failure.

While involvement of oxidative stress in cardiovascular diseases has long been appreciated, many mechanisms remain unclear and most of the antioxidant therapies failed to reach their endpoints. Recently, I demonstrated that specifically targeting eNOS-dependent ROS generation is a new therapeutic strategy to reverse pressure-overload induced heart failure (Circulation Moens et al., May 2008). Upon our knowledge, this new therapeutic concept is one of the few therapeutic possibilities to reverse decompensated ventricular remodeling.

The novelty of this research project around specific targeting eNOS-uncoupling, with subsequent prevention and/or reversion of heart failure.

Thus, this research project will greatly amplify what can be accomplished by using eNOS-modulators to improve myocardial function, leading to even more exciting and novel advances and more rapid progress in translating this new knowledge into clinical treatments of heart failure.

## 3. Alternatieven

There is no change, reduction or adaptation possible of the actual study-design. Cell-culture are not possible to determine the goals of this particular study. No human material can be made available on a ethical way to explore the effect of AVE3085 on eNOS-uncoupling. There are no alternatives for the use of mice in this project regarding eNOS-uncoupling and heart failure.

Important remark: To reduce the number of animals, we will not perform animal experiments in Control and Placebo group. We will use data from the former experiment (DEC 2010-008)

## 4. Ethische afweging

Heart failure is a terminal heart disease. There are almost no therapeutical options to reverse pre-existing heart failure. We recently demonstrated that re-coupling of eNOS does have a role in the reversing process. Therefore, better understanding of the exact trigger of eNOS-uncoupling and

hence administration of eNOS-modulators is of enormous importance to tackle the failing heart. The use of mice, the indicated numbers and the expected mortality are justified. We are aware of the severity of the symptoms that heart failure can cause to mice with pressure-overload. We have no possibility to reduce the symptoms of heart failure in this model of heart failure. We will follow up the condition and well-fare of the animals very strictly.

## 5. Wetenschappelijke onderbouwing

**Background:** Nitric oxide (NO) generated by the enzyme endothelial NO synthase (eNOS) plays a key role in cardiomyocyte contractility and vascular tone. Oxidative stress reduces the bioavailability of tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, an essential cofactor of eNOS), resulting in uncoupling of the dimeric enzyme eNOS towards a monomeric form with a subsequent decrease of nitric oxide (NO) production and an increase of the superoxide generation. Increasing evidence demonstrates an important pathogenetic role of eNOS uncoupling in the pathogenesis of several oxidative stress-related cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis, and as shown recently, cardiac hypertrophy and heart failure. Since uncoupled eNOS can increase the production of ROS, promote BH<sub>4</sub> oxidation, and self-limit NO biosynthesis. Therefore, modulating eNOS uncoupling is an attractive therapeutic approach in the endothelial dysfunction. Recent studies have demonstrated that AVE3085 showed concomitant the increase in eNOS transcription and eNOS protein levels and BH<sub>4</sub> levels in animal models of atherosclerosis and hypertension. AVE3085 restored impaired endothelial function in these models. Although pre-clinical studies for AVE3085 seem promising, they are hampered by the lack of agreement as to the mechanism by which AVE3085 activates eNOS activity.

### Endpoints/Objectives:

**Primary endpoint:** Effect of different dosages of the eNOS-modulator AVE3085 on eNOS-uncoupling in different stages of heart failure (hypertrophy, dilation, decompensation) – used method: monomer/dimer visualisation

**Sec endpoint:** Effect of different dosages of the eNOS-modulator AVE3085 on eNOS-uncoupling dependent superoxide generation (total and sources) in different stages of heart failure. -> used method: Lucigenin and DHE + addition of specific inhibitors (all in vitro).

Nothing is known about the best dosis of AVE3085 to obtain a beneficial effect in the myocardium. Therefore it is absolutely needed to do a minimal dose-response-analysis. 30mg/kg/d is the recommended 'vascular' dose. Often, especially for NO-related medication there is a different dose needed to obtain a beneficial effect in the myocardium vs. vasculature. The need of a dose-response curve for this type of drugs is underlined in the recent publication of Moens (JMCC, 2011). The model of mild and severe TAC is the repercussion of two different clinical situations of pressure overload. Mild TAC is a model of pressure-overload due to hypertension (in the clinic this is also a very smooth progression). Severe TAC is the model of pressure-overload due to severe aortic stenosis. 1wk is the model of hypertrophy of the ventricular wall, 5wk of dilation without decompensation and 10wk is the model of dilation with decompensation (=end stage heart failure).

Rationale for the chosen study-design (different dosages, different models, different time-points) is needed because:

- Dosage: Exclusion of bimodal response/determination therapeutic window. No direct correlation with dosis in the vasculature to dosis in the pressure-overload myocardium

- Models: Different clinical situations
- Times: Different stages from pressure-overload heart failure (hypertrophy, dilation, decompensation).

#### **6. Wetenschappelijke beoordeling**

- \* This DEC protocol is scientifically judged and approved by \_\_\_\_\_ (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.

## 6 Proefdier

### 7. Proefdier keuze

#### 7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Mice, C57Bl6, euthanasia (overdosis isoflurane).

#### 7b. Sexe

Male: Estrogens does have a cardioprotective affect in heart failure models. This results are not reliable and can interfere with each other.

#### 7c. Aantallen

*Animals needed to explore the hypothesis:*

**Moderate TAC** - The transverse aorta was constricted by tying a suture around the vessel over a 25-gauge blunted needle causing occlusion of the aorta

**Severe TAC** - The transverse aorta was constricted by tying a suture around the vessel over a 27-gauge blunted needle causing occlusion of the aorta

All group (1 to 11) are calculated to have a final n of 7

eNOS uncoupling (read-out parameter) weten we uit gepubliceerde resultaten (Moens, Circulation 2008): *eNOS-uncoupling is the main topic from this research project and subsequently is visualisation of eNOS-uncoupling the primary and correct reading parameter.*

Delta = 0.25 en Sigma 0.15

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

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

Dus  $n = 15,7 * (\frac{\sigma}{\delta})^2$

De spreiding ( $\sigma$ ) wordt geschat op 0.15%. Het beoogde effect (d) wordt geschat op 0.25%.

Dit geeft;  $n = 15,7 * (0.15/0.25)^2 = 5.652$

Echter uival is 12.5% :

$$0.875a=5.652$$

$$a=5.652/0.875$$

$$a=6.46$$

Dus  $a=6.46 \rightarrow$  afgerond dus  $n = 7$

$\rightarrow$  Total  $n = 7 \text{ animals} \times 11 \text{ (groups)} = 77$

**Explanation of drop-outs:**

TAC 10 wk with AVE3085 treatment, drop out stays around 12.5% due to mal-compensation to pressure-overload (lung congestion). The drop-out is an estimation of the beneficial effect of AVE3085. Without treatment (no experiments in this DEC) have a drop-out of around 25% (due to congestive heart failure). We do expect that this dropout will be reduced with AVE3085 because this drug might interfere with eNOS-uncoupling i.e. recoupling, which is the key player in the onset of heart failure. Again, this is a reasonable and well-considered estimation. There is no further way to reduce these drop-out ratios in the non-treated groups. These drop-out ratios are part of this model (similar to model at Johns Hopkins University) and are an unavoidable part of this project (idem to patients with terminal heart failure).

We do hope and expect that a higher dose of AVE3085 will result in a better outcome. However, we do have no idea that a higher dose of AVE3085 will result in more eNOS uncoupling (due to stoichiometric changes), with subsequent more ROS generation.

## 8 Dierproef

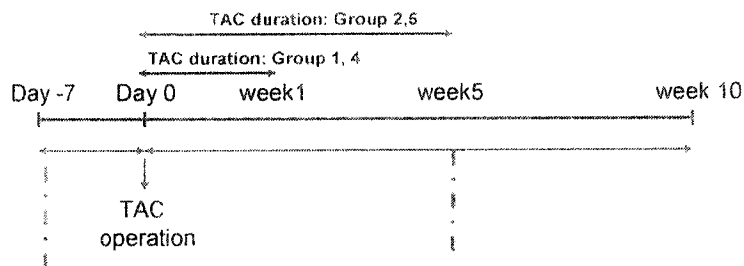
### 8. Experiment

| Group                                      | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7      | 8         | 9         | 10     | 11     |  |
|--------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|--------|--------|--|
| Type of TAC<br>(M = moderate;<br>S=severe) | M         | M         | M         | S         | S         | S         | S      | S         | S         | S      | S      |  |
| Duration of TAC (wk)                       | 1         | 5         | 10        | 1         | 5         | 10        | 10     | 10        | 10        | 10     | 10     |  |
| Dose of AVE3085 (mg/kg/day)                | 30        | 30        | 30        | 30        | 30        | 30        | 30     | 3         | 300       | 3      | 300    |  |
| Treatment period<br>From :                 | beginning | beginning | beginning | beginning | beginning | beginning | Week 5 | beginning | beginning | Week 5 | Week 5 |  |
| n total                                    | 7         | 7         | 7         | 7         | 7         | 7         | 7      | 7         | 7         | 7      | 7      |  |

We plan to do surgery 14 animals/ month and randomize them completely

AVE3085 is mixed in transgenic dough ; ), similar to et al. Circulation May 2008  
Experimental plan

### Experimental plan



AVE3085 treatment (pre-treatment)

Group 1, 2, 3, 4, 5, 6 (30 mg/kg/day)  
Group 8 (3 mg/kg/day)  
Group 9 (300 mg/kg/day)

AVE3085 treatment (from wk5, reversing period)

Group 7 (30 mg/kg/day)  
Group 10 (3 mg/kg/day)  
Group 11 (300 mg/kg/day)

#### Echocardiogram

Group 1, 4 → day 0, week 1

Group 2, 5 → day 0, week 1, 5

Group 3, 6, 7, 8, 9, 10 → day 0, week 1, 5, 10

**Sacrifice**

Group 1,4 → week1

Group 2,5 → week5

Group 3,6,7,8,9,10 → week10

**9. Experimentele condities****9a. Anesthesie**

Premedication : Morfine (0.2 mg /kg - s/c) at least 20 minutes prior the surgical procedure

Etomidate 8mg/kg ip (3x) and isoflurane 3-4%.

*NSAID-pijnstilling post-operatief is niet mogelijk gezien het effect van COX-inhibitie op endotheelfunctie (en aldus interferentie met het studie-design, nl de NO-pathway).*

*De proefdierdeskundige suggereert de frequentie morfine-injecties post-chirurgie te verhogen, dit werd aangepast in het protocol en SOP.*

**9b. Pijnbestrijding**

Morfine sc before and 1h after surgery (0.2 mg /kg sc), afterwards 6x/d, 2days post-op

**9c. Euthanasie en Humane eindpunten**

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:

- **Weight loss:** loss of 20-25% or if not measured, characterized by cachexia and muscle wasting.
- **Inappetance:** complete anorexia for 24 hours or less than 50% of caloric requirement
- **Weakness/inability to obtain feed or water:** Inability or extreme reluctance to stand which persists for 24 hours
- **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)
- **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.
- **Signs of severe organ system dysfunction non-responsive to treatment, or with a poor prognosis as determined by an RAR veterinarian:**

**Respiratory:** dyspnea, cyanosis.

**Cardiovascular:** blood loss or anemia resulting in hematocrit below 20% **Gastrointestinal:** severe vomiting or diarrhea, obstruction, intussusception; peritonitis, evisceration (immediate euthanasia required).

**Urogenital:** renal failure characterized by elevated BUN, creatinine or uroperitoneum.

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

**Musculoskeletal:** muscle damage, bone injury, locomotor deficits, etc. resulting in inability to use the limb, unless anticipated as part of the study.

**Integumentary:** Non-healing wounds, repeated self-trauma, second or third degree heating pad burns.

## Zorg

**10a. Ongerief**

Open chest surgery type transverse aortic constriction (score 05) in each animal. This procedure takes place once in each animal. During the surgical procedure and the final experiment the animals are anesthetized (code 2). The total procedure takes less than 10 minutes. Afterwards animals will receive Morphine sc for 3 consecutive days.

Administration of medication: no discomfort (score 01). Medication will be mixed in transgenic dough from (Moens et al Circ 2008, Takimoto et al JCI 2006 etc). A terminal experiment will be performed under isoflurane anesthesia (score 02) and afterwards the animals will be euthanized by an overdosis of isoflurane.

Total: Score 05.

| Aard van handeling                                                                            | Ernst score<br>ongerief | Duration                                                                                                 | Frequentie                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pretreatment met medicatie welke geen gekende neveneffecten heeft (gemixed in voeding)</b> | no                      | Voeding is toegankelijk gans de dag.                                                                     | Dagelijks van 7d voor tot eind experiment (=afh van groep max 10wk na start TAC) |
| <b>Inductie anesthesie (met Intubatie)</b>                                                    | 2                       | 1 min max                                                                                                | 1x                                                                               |
| <b>Injectie premedicatie, sc</b>                                                              | 2                       | 10 sec                                                                                                   | 1x                                                                               |
| <b>Injectie pijnremming post-op</b>                                                           | 2                       | 10 sec                                                                                                   | 6x/d                                                                             |
| <b>Ontwaken uit anesthesie na TAC-procedure</b>                                               | 5                       | 8-10 min                                                                                                 | 1x                                                                               |
| <b>Leven met TAC (kans op verminderde activiteit, long congestie, cachexie)</b>               | (3)-5                   | Theoretisch mogelijk gans de TAC periode (i.e. max 10 wk afh van groep). In de praktijk vnl in week 8-10 | max 1x                                                                           |
| <b>Hair removal with 'veet' prior to short axis evaluation</b>                                | 2                       | 3-5 min                                                                                                  | Max 3x                                                                           |
| <b>Short Axis evaluation</b>                                                                  | 3                       | 3 min                                                                                                    | Max 3x                                                                           |
| <b>Euthansia</b>                                                                              | 2                       | 3 min                                                                                                    | 1x                                                                               |

|                                                        | Discomfort | Freq | Duration                 |
|--------------------------------------------------------|------------|------|--------------------------|
| TAC operation:                                         | Code 05    | 1x   | 10 mins                  |
| Consequences of TAC operation:<br>(possible)           | Code 05    | 1x   | Variable (no estimation) |
| Hair removal with veed prior the short axis evaluation | Code 02    | 3x   | 3-5mins                  |
| Short axis evaluation                                  | Code 03    | 3x   | 3 mins                   |
| Euthanasia:                                            | Code 02    | 1x   | 3 min                    |

Clinical signs of heart failure in mice can be identified by means of observation of the body weight loss, the decreased activity, abnormal breathing patterns due to pleural effusions (labored breathing, dyspnea, respiratory distress) and blue extremities

#### 10b. Welzijnsevaluatie

Discomfort scoring sheets will be used for welfare assessment. The scoring sheet is applied from the "scoringslijst" which is recommended by , the animal welfare officer of CPV

We do not have directly related results from previous studies, because we did not do any study with AVE3085. However, with the eNOS modulator BH4 we have seen that it can recouple the uncoupled NOS and reverse heart failure ( Moens et al., Circulation 2008). However, recently published that the effect of BH4 on pressure-overload induced heart failure does have a biphasis dose-response, with subsequently a narrow therapeutic window ( Moens et al., JMCC, 2011).

Animal Welfare Score Sheet : Total score > 25 (-30) is Moribund and will be euthanized (this is the sheet that is actually used at CPV):

Spp. /strain C56Bl/6 Date of Tx/ operation \_\_\_\_\_ DEC \_\_\_\_\_

Barcode \_\_\_\_\_ Animal number \_\_\_\_\_ Cage \_\_\_\_\_ Remark \_\_\_\_\_

Bodyweight upon arrival (day -7) \_\_\_\_\_

Bodyweight on experiment(day0) \_\_\_\_\_

Date

Day

BODY WEIGHT & B.A.R (bright, alert, responsive) SCORE (normal is 0, score 1,2,3 for á in severity)

Body wt yesterday

Body wt today

Body wt change

GENERAL CLINICAL SIGNS\* (score normal animal as 0, score 1,2,3 for á in severity)

Coat rough-fur on end

Red eye / nose discharges

Dehydration (PTO test)

ACTIVITY AND EXPLORATION SCORING (score normal animal as 0, score 1,2,3 for á in severity)

Activity

Score 0: a normal active and curious behavior. It moves about and stands upright at the sides of the cage.

Score 1: not quite as active. It does not stand up so often, and prefers to stay in the corners of the cage.

Score 2: less active, and when it moves it often stops and sits. It stays in the nest corner.



Score 3: moves only when touched, and only for a short distance. It preferably hides in the nest corner.

Score 4: The mouse is moribund.

BEHAVIOURAL SIGNS OF PAIN (score Yes or No; or normal animal as 0, score 1, 2, 3 for á in severity)

Hunched posture

Belly press (presses belly to cage floor)

Writhe (twisting of body or flank)

Stagger (sudden loss of balance / gait)

Twitch (sudden spasm of flank muscles)

Fall (rat falls over)

ABNORMAL NERVOUS SIGNS (score Yes or No; or normal animal as 0, score 1, 2, 3 for á in severity)

Circular movement

Seizures

Paralysis

## 11. Verzorging en huisvesting

Regular housing CPV.

Transgenic dough diet, a complete diet, with AVE3085, formed into balls of 2.4-2.6g each. Supplementation and therefore amount of feed per cage is calculated on a per-animal basis. Transgenic diet will be available ad libitum.

Animal will be housed in groups of 2 or 3 in cage enrichment.

## 12. Deskundigheid

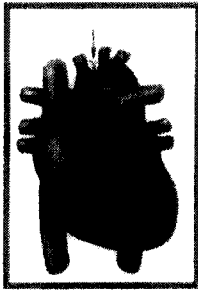
are very experienced in this type of protocol

## 13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie SOP: Transverse aortic surgery.

## Relevante literatuur

See attachment ( Moens et al. 2008, Moens et al, 2011 and Wholfart et al 2008



## SOP CARDIOLOGIE - Lab TRANSVERSE AORTIC CONSTRICTION (TAC)

Discomfort score 05

Art 9.

Art 9.

Mice (age 9-11wk, 21-24 g body wt) will be housed in an air-conditioned room with a 12:12-h light-dark cycle and fed standard mouse chow and tap water ad libitum, will undergo transverse aortic constriction (TAC, 65-70%) to produce in an early phase pressure-load hypertrophy and severe ventricular dilatation/heart failure.

Advantages of this technique:

- Hypertrophy in an early phase i.e. starts at day 3 and already after 1 wk pronounced hypertrophy
- Severe ventricular dilatation, which starts at week 5-6 with subsequently severe decompensation (heart failure) at week 10-12.
- Is model of end stage heart failure
- Very fast technique ( average 8min from start incision to closing chest).

Preparation: Determine weight of animal. Start preheating surgery path.

Premedication and Anesthesia: Premedication with Morfine (0.2 mg /kg - s/c) at least 20 minutes prior the surgical procedure. Anesthesia will be induced with isoflurane 5% (if needed add etomidate 0.8ml, i.p, up to 3x.) and after the intubation (16G plastic tube) maintained by 2% isoflurane gas in room air supplemented with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>.

Setting Ventilator: The mice will be placed on a volume ventilator (Freq 210/min and volume 250 µl). Fixate the tube and the animal ( 4 legs).

Surgical procedure:

1. Shave chest and disinfect with Jodium
2. Treat eyes with eye-creme (Visagel)
3. Make a small incision parasternal left.
4. Enter the extrapleural space between the second and third rib
5. Check quality of ventilation. Look to both lungs ( color ok, moving symmetrical)
6. Remove fat in aortic area with electric coagulator/cutter.
7. Push thymus sideways. Be very careful for bleeding. If needed use coagulator.

8. Now you have view on the aortic arch. Take special forceps and lift aortic arch up. Do not use hooks. The transverse aorta will be isolated between the right and left carotid arteries. A 7-0 prolene suture ligature will be tied around the transverse aorta against a 27-gauge needle to produce a 65–70% constriction after the removal of the needle. Make a double knot. Avoid >5 sec occlusion.
9. The chest will be closed using 6-0 silk suture and negative pressure in the thorax is returned via removal of air by a PE-50 chest tube attached to a syringe.
10. After removal of the air, the skin will be closed with 5-0 silk, and the animals will be extubated.
11. After subcutaneous injection of morphine sulphate 0.2 mg, the mice will be transferred back to their cages. Place the cages on a heating path.
12. Animal's respiratory and circulatory status will be checked every 30 minutes during the first 2 hours.
13. Repeat morphine (0.2 mg/kg sc), every 4-6h for the following 2-3d
14. After checkup of the wound, animals are brought back to animal holding rooms.
15. Sham-operated mice will undergo the same operation except for aortic constriction.

References: Takimoto et al. JCI 2005, Moens et al. Circulation 2008 and Moens et al. JMCC 2011.

## Transverse aorta constrictie (TAC) bij de muis ( \_ \_ \_ \_ \_ )

### Pre-operatief

- De muis wordt gewogen.
- Er wordt (min 30 minuten van tevoren) buprenorfine dosis: 0,05-0,1 mg/kg LG toegediend.

Verdun 1 deel buprenorfine (0,3mg/ml) in 19 delen steriel water ( NaCl 0.9%)

Injecteer het dier met buprenorfine: 0,034-0,067ml/10g sc elke 6-12uur op effect

→ richtdosis: 0,05 ml/10g (0,075mg/kg BW)

### Narcose:

- Inleiding met isofluraan ( 3-4% in zuurstof 100%)
- Onder anesthesie gehouden met isofluraan ( 1.5-2.5% in zuurstof )
- Intuberen met een afgestompte naald (20 Gauge).
- De muis wordt geventileerd met een slagvolume van 250µl en een slagritme van 150-210 slagen per minuut.

### Voorbereiding:

- Hals en borstkas scheren en operatiegebied ontharen met ontharingscrème, afwassen/ spoelen en drogen (desinfecterende zeep / steriel fysiologisch zout)
- Ogen behandelen met Oogdruppels of zalf.
- De muis wordt op de rug gelegd.
- De muis fixeren.
- Desinfecteren met jodium en afdekken met operatiefolie.
- De muis krijgt pre-operatief steriele en verwarmde (37°C) NaCl 0.9% (0.5 ml subcutaan) toegediend.
- Er wordt aseptisch gewerkt.

### Operatie:

- Controleer de diepte van de anesthesie
- De huid craniaal ( hoofdzijde) van het sternum, voor de eerste rib wordt ingeknipt om een helder beeld te krijgen van de thorax.
- Let vooral op de kleine bloedvaatjes die in het gebied lopen.
- De onderliggende spierlaag wordt voorzichtig gekliefd. Indien de aorta nog niet duidelijk zichtbaar is, wordt het sternum craniaal ingeknipt tot aan de tweede rib. De wonde wordt met wondspreaders opgehouden om een goed zicht op de thymus te hebben.
- De thymus wordt voorzichtig gesplitst in zijn twee lobjes, waaronder de aortaboog zich bevindt.
- Prepareer de aortaboog vrij van weefsels bijv: vlies, vet tussen de de trunks brachiocephalicus en de linker carotis arterie (1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> 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 prolene).
- 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 met enkelvoudige hechtingen (hechtmateriaal 5-0).
- De spierlaag wordt gesloten met enkelvoudige hechtingen (hechtmateriaal 5-0).
- De huid wordt gehecht met (hechtmateriaal 5-0).
- Er wordt wederom 0.5 ml Steriele en verwarmde NaCl 0.9% subcutaan toegediend.
- 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, slikreflex aanwezig), wordt de intubatiennaald verwijderd

#### Postoperatieve zorg:

- Geopereerde muizen worden teruggelegd op een tissue in een kooi in de verkouverkamer (30 C°). Het dier wordt geobserveerd tot het zich kan verplaatsen.
- (Geweekte) brokken ( eventueel icm special care feed) worden op de bodem van de kooi gelegd om voer en vochtopname te stimuleren.
- Pijnbestrijding:  
Tijdens de operatiedag krijgen de dieren aan het einde van de dag een subcutane injectie met buprenorfine dosis: 0,05-0,1 mg/kg LG (elke 8-12 uur op effect). Ook de twee volgende dagen worden de dieren 's morgens en 's avonds met buprenorfine behandeld om een adequate pijnbestrijding te kunnen garanderen.
- Het herstel van de operatiewond wordt gevolgd en vastgelegd in het welzijnsdagboek en operatieverslag.



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

Maastricht, 6 juli 2011

\* Betreft: Projectnummer 2011-080

Directeur

Geachte

Hierbij bevestig ik, is, dat het project met  
projectnummer 2011-080

"Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of  
pressure- overload induced myocardial dysfunction by modulating  
eNOS-uncoupling",

wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is.

In de hoop u voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Hoofd afdeling



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, 05-07-2011

Geachte Onderzoeker,

De DEC-UM heeft uw aanvragen 2011-080/081/082/083/084 en 085 in goede orde ontvangen. De aanvragen hebben op de agenda van de DEC-UM gestaan voor de vergadering van 24 juni jongstleden.

De behandeling van project 2011-080 en 2011-081 heeft buitenproportioneel veel tijd gekost en daarom heeft de DEC-UM project 2011-082/083/084 en 085 niet kunnen behandelen.

**Algemene opmerking bij alle aanvragen:**

De DEC-UM ziet niet hoe de gekozen opzet van het onderzoek correspondeert met de doelstelling van dit onderzoek.

Separaat zullen wij u het commentaar van protocol 2011-080 en 2011-081 doen toekomen en verzoeken u de aanvragen 2011-082/-083/-084 en 085 nog eens na te kijken en het commentaar op project 2011-080 en 2011-081 hierbij te gebruiken en waar nodig de aanvragen te corrigeren en opnieuw in te dienen.

Omdat u het commentaar redelijk laat heeft gekregen en de vergadering 2 weken eerder is dan gepland, zullen wij u de tijd geven tot en met zondag 10 juli 2011 om de aanvragen aan te passen, zodat wij deze eventueel kunnen behandelen op de vergadering van 15 juli aanstaande. De eerstvolgende vergadering daarna is 26 augustus 2011.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

**DEC**

Aan:

Wim H. J. Meuwissen, voorzitter  
p/a Secretariaat DEC-UM  
Postbus 616  
NL-6200 MD Maastricht  
Telefoon: 0

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 05-07-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *"Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling"*, is op de DEC vergadering van 24 juni 2011 besproken.

**Algemene opmerking:**

De DEC-UM ziet niet hoe de gekozen opzet van het onderzoek correspondeert met de doelstelling van dit onderzoek.

Vervolgens heeft de DEC de volgende vragen en opmerkingen:

- De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.
- Bij punt 4- de ethische afweging- dient het ernstige ongerief mee betrokken te worden in de afweging. De definitiefheid van deze stelling mag genuanceerd worden (absolutootly verwijderen). Het moet een ethische afweging zijn.
- Bij punt 5 wordt genoemd wat de doelstelling is. De locatie and trigger van eNOS koppeling zal nader onderzocht worden. Het is de DEC bij punt 7 niet duidelijk hoe dit op basis van de voorgestelde metingen (westernblot analyse van het gehele hartje) gedaan kan worden. Ditzelfde geldt ook voor de te verwachten effecten op remodeling.
- Het doel van de proef is het beïnvloeden van de hartremodelering/functie, dientengevolge zou dit dan ook de primaire read out parameter moeten zijn voor de statistische berekening en niet de eNOS koppeling.
- Bij punt 6 verzoekt de DEC aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol (2011-080) wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd. De DEC kan een aanvraag niet goedkeuren wanneer dit DEC protocol (document) niet wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is. Dit staat dus los van de NWO goedkeuring van het VIDI projectvoorstel, aangezien dit DEC protocol op zich zelf staat.

- Bij punt 7c wenst de DEC de onderbouwing van  $N=6$ . Er wordt verondersteld dat de uitkomst van de power analyse uitkomt op 6. De DEC verzoekt de berekening, welke gebaseerd is op de spreiding en beoogd effect, toe te voegen. Daarnaast merkt de DEC nogmaals op dat wanneer het doel van de proef is om de hartremodellering te beïnvloeden, de berekeningen van de groepsgroottes dan ook gebaseerd dienen te worden op een parameter van remodellering.
- De DEC wenst de motivering voor 12½ % uitval.
- Voor een goed wetenschappelijk dierexperimenteel onderzoek is een statistische berekening vereist, voor zowel het experimenteel design, alsook de analyses, welke los staan van de eisen van een eventueel vakblad.
- De berekening van de uitval dient juist berekend te worden (op het originele aanvraagformulier van de DEC, zie website CPV, staat de juiste formule voor de berekening). Gezien dit meerdere keren is aangegeven is ter illustratie een voorbeeld toegevoegd. Als uit de groepsgrootte een  $n$  van 10 blijkt. Een uitval van 50% wordt verwacht. Voorbeeld foute berekening.  $10 * 1,5 = 15$  dieren. Bij sterfte van 50% blijven er 7,5 dieren over. Dus een tekort aantal dieren. Voorbeeld juiste berekening.  $10/0,5 = 20$  dieren. Bij sterfte van 50% blijven er 10 dieren over.
- Punt 8- De DEC merkt op dat een gefaseerd design de voorkeur heeft, te beginnen bij het laatste tijdstip. Immers, bij uitblijven van effecten op dit laatste tijdstip is de relevantie van eventuele eerdere behandelingseffecten sterk te betwijfelen.
- Bij punt 8 merkt de DEC op, omwille de standaarddeviatie te beperken, het wellicht beter zou zijn de proef in een kort tijdbestek af te ronden.
- Punt 9a- Het begrip morfine/ buprenorphine worden door elkaar gebruikt. Dit zijn 2 verschillende stoffen. De DEC verzoekt aan te geven welke van toepassing is, met de juiste dosering en behandelingsfrequentie.
- Punt 9a- De tekst vanaf "Due to the procedure" enzovoort verwijderen.
- Punt 9a- De DEC verzoekt het additioneel commentaar te verwijderen tot de laatste 4 regels, dit acht de DEC niet relevant.
- Punt 9b- De pijnbestrijding is niet correct. De DEC verzoekt hierover contact op te nemen met de proefdierdeskundige. Het in grijs gemarkeerd commentaar verwijderen.
- Punt 9c- In dit DEC protocol achten wij het "Moribund state" item te laat. De DEC verzoekt vroeger in te grijpen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (ook het leven met TAC).
- Punt 10b- De DEC verzoekt het grijs gemarkeerde deel te verwijderen. De DEC wil graag een welzijnsevaluatie, gebaseerd op de bevindingen uit een gelijkaardige experimentele studie (TAC) in Maastricht.
- In de SOP staat niet duidelijk vermeld hoe de TAC wordt uitgevoerd om zodoende een inschatting te kunnen maken om het ongerief in te kunnen schatten. De vraag hierover van de art.14 functionaris tijdens de screening is niet beantwoord. De DEC verzoekt dit alsnog te doen.

#### 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 2011-080, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

*Antwoorden op vragen betreffende DEC 2011-080 'pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling'*

**Vraag 1:** De duur van de proef op het voorblad is niet juist (dit is de langste periode binnen één project dat één dier in proef is). De DEC verzoekt dit aan te passen.

Antwoord 1: dit is aangepast ( 1 wk pretreatment + 10 wk max pressure overload = 11wk).

**Vraag 2:** Bij punt 4- de ethische afweging- dient het ernstige ongerief mee betrokken te worden in de afweging. De definitiefheid van deze stelling mag genuanceerd worden (absolutely verwijderen). Het moet een ethische afweging zijn.

Antwoord 2: - We hebben het ernstig ongerief toegevoegd aan punt 4 'We are aware of the severity of the symptoms that heart failure can cause to mice with pressure-overload. We have no possibility to reduce the symptoms of heart failure in this model of heart failure. We will follow up the condition and well-fare of the animals very strictly.

- Absolutely is verwijderd.

**Vraag 3:** Bij punt 5 wordt genoemd wat de doelstelling is. De locatie and trigger van eNOS koppeling zal nader onderzocht worden. Het is de DEC bij punt 7 niet duidelijk hoe dit op basis van de voorgestelde metingen (westernblot analyse van het gehele hartje) gedaan kan worden. Ditzelfde geldt ook voor de te verwachten effecten op remodeling.

Antwoord op vraag 3: Wij realiseren ons de onduidelijkheid bij punt 5. Excuses hiervoor. We hebben de onderzoeksvragen meer schematisch nu gedefinieerd:

**Primary endpoint:** Effect of different dosages of the eNOS-modulator AVE3085 on eNOS-uncoupling in different stages of heart failure (hypertrophy, dilation, decompensation) – used method: monomer/dimer visualization. **Sec endpoint:** Effect of different dosages of the eNOS-modulator AVE3085 on eNOS-ucoupling dependent superoxide generation (total and sources) in different stages of heart failure. -> used method: Lucigenin and DHE + addition of specific inhibitors ( all in vitro). Al deze methodology kan gebeuren op 1 hartje ( in praktijk: free wall voor prim endpoint en DHE en lucigenin op septum).

**Vraag 4:** Het doel van de proef is het beïnvloeden van de hartremodelering/functie, dientengevolge zou dit dan ook de primaire read out parameter moeten zijn voor de statistische berekening en niet de eNOS koppeling.

Antwoord 4: Wij verwijzen hierbij naar antwoord 3. Wij hebben punt 1 (doel van de proef) meer schematisch beantwoord en excuseren ons voor deze onduidelijkheden. We hebben in de 'primary' endpoint beschrijving vermeld dat de primary read out eNOS-uncoupling is en hebben onze statistiek hier dan ook op aangepast ( zie ook vraag 6).



Vraag 5: Bij punt 6 verzoekt de DEC aan te geven door wie of welke commissie dit DEC protocol (2011-080) wetenschappelijk is beoordeeld en goedgekeurd. De DEC kan een aanvraag niet goedkeuren wanneer dit DEC protocol (document) niet wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is. Dit staat dus los van de NWO goedkeuring van het VIDI projectvoorstel, aangezien dit DEC protocol op zich zelf staat.

Antwoord 5: Wij begrijpen de rationale. Bij punt 6 is aangegeven dat 'Dit protocol wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is door de vakgroepvoorzitter is tevens op het voorblad vermeld als vakgroepvoorzitter/wetenschappelijk beoordeelaar. Zijn beoordeling/goedkeuring is toegevoegd in bijlage.

Vraag 6: Bij punt 7c wenst de DEC de onderbouwing van  $N=6$ . Er wordt verondersteld dat de uitkomst van de power analyse uitkomt op 6. De DEC verzoekt de berekening, welke gebaseerd is op de spreiding en beoogd effect, toe te voegen. Daarnaast merkt de DEC nogmaals op dat wanneer het doel van de proef is om de hartremodellering te beïnvloeden, de berekeningen van de groepsgroottes dan ook gebaseerd dienen te worden op een parameter van remodelleering.

Voor uitleesparameter (uncoupling): gemiddeld 0,5; standaarddeviatie 0,125; delta 0,25;  $N1 = N2 = 5,25 \rightarrow$  afgerond 6

Vraag 7: De DEC wenst de motivering voor 12½ % uitval.

Antwoord 7: Wij hebben volgende paragraaf toegevoegd aan de aanvraag: 'The dropout is an estimation of the beneficial effect of AVE3085. Without treatment ( no experiments in this DEC) have a dropout of around 25% ( due to congestive heart failure). We do expect that this dropout will be reduced with AVE3085 because this drug might interfere with eNOS-uncoupling i.e. recoupling), which is the key player in the onset of heart failure. Again, this is a reasonable and well-considered estimation'.

Vraag 8: Voor een goed wetenschappelijk dierexperimenteel onderzoek is een statistische berekening vereist, voor zowel het experimenteel design, alsook de analyses, welke los staan van de eisen van een eventueel vakblad.

Antwoord vraag 8: Zie vraag 6. Eisen vakblad zijn verwijderd

Vraag 9: De berekening van de uitval dient juist berekent te worden (op het originele aanvraagformulier van de DEC, zie website CPV, staat de juiste formule voor de berekening). Gezien dit meerdere keren is aangegeven is ter illustratie een voorbeeld toegevoegd. Als uit de groepsgrootte een  $n$  van 10 blijkt Een uitval van 50% wordt verwacht. Voorbeeld foute berekening.  $10 * 1,5 = 15$  dieren. Bij sterfte van 50% blijven er 7,5 dieren over. Dus een tekort aantal dieren. Voorbeeld juiste berekening.  $10/0,5 = 20$  dieren Bij sterfte van 50% blijven er 10 dieren over.

Antwoord 9: Excuses voor deze miscalculatie. De oorspronkelijke groepsgrootte moet 7 zijn, zodanig dat na 12,5 uitval (0.875 i.e. 1), de uiteindelijke groepsgrootte 6 wordt. Dit is aangepast in de aanvraag.

Vraag 10: Punt 8- De DEC merkt op dat een gefaseerd design de voorkeur heeft, te beginnen bij het laatste tijdstip. Immers, bij uitblijven van effecten op dit laatste tijdstip is de relevantie van eventuele eerdere behandelingseffecten sterk te betwifelen.

Antwoord 10: We begrijpen het standpunt van de DEC volledig, echter bij ischemie/reperfusie-injury (in alle weefsels) is er een fenomeen genaamd: reperfusion-induced oxygen burst. Deze burst van vrije radicalen ontstaat bij onmiddellijke opening van het vat en is dus van een andere orde dan de 'continue' productie van vrije radicalen tijdens IR. Enkel het laatste tijdstip testen is aldus onvolledig.

Vraag 11: Bij punt 8 merkt de DEC op, omwille de standaarddeviatie te beperken, het wellicht beter zou zijn de proef in een kort tijdbestek af te ronden.

Antwoord 11: Wij hebben begrip voor de situatie, maar zijn ook gebonden aan praktische zaken. We hebben nu vermeld in de aanvraag dat we het werkschema zullen proberen te versnellen

Vraag 12: Punt 9a- Het begrip morfine/ buprenorphine worden door elkaar gebruikt. Dit zijn 2 verschillende stoffen. De DEC verzoekt aan te geven welke van toepassing is, met de juiste dosering en behandelingsfrequentie.

Antwoord: excuses voor deze irregulariteit. Buprenorphine werd verwijderd en de dosis/toedieningswijze/frequentie van morfine zijn nu duidelijk vermeld.

Vraag 13: Punt 9a- De tekst vanaf "Due to the procedure" enzovoort verwijderen.

Antwoord: Dit werd verwijderd.

Vraag 14: Punt 9a- De DEC verzoekt het additioneel commentaar te verwijderen tot de laatste 4 regels, dit acht de DEC niet relevant.

Antwoord: Dit werd verwijderd

Vraag 15: Punt 9b- De pijnbestrijding is niet correct. De DEC verzoekt hierover contact op te nemen met de proefdierdeskundige. Het in grijs gemarkeerd commentaar verwijderen.

Antwoord: De pijnbestrijding werd als volgt aangepast: Morfine (0.2 mg /kg - s/c) at least 20 minutes prior the surgical, 6x/d, 2d postop procedure

Vraag 16: Punt 9c- In dit DEC protocol achten wij het "Moribund state" item te laat. De DEC verzoekt vroeger in te grijpen.

Antwoord: Wij hebben dit besproken met . Een well fare score is nu toegevoegd alsook een cut-off score waarde is aangeduid, zodanig dat dieren voor de Moribund state geëuthaniseerd worden.

Antwoord: De Well-fare score werd toegevoegd aan de aanvraag. Een score  $\leq 25$  (-30) wordt aanzien als Moribund.

Vraag 17: Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven (ook het leven met TAC).

Antwoord vraag 17: Onderstaande tabel werd toegevoegd aan 10a.

| Aard van handeling                                                                            | Ernst score ongerief | Duration                                                                                                 | Frequentie                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pretreatment met medicatie welke geen gekende neveneffecten heeft (gemixed in voeding)</b> | no                   | Voeding is toegankelijk gans de dag.                                                                     | Dagelijks van 7d voor tot eind experiment (=afh van groep max 10wk na start TAC) |
| Inductie anesthesie (met Intubatie )                                                          | 2                    | 1 min max                                                                                                | 1x                                                                               |
| <b>Injectie premedicatie, sc</b>                                                              | 2                    | 10 sec                                                                                                   | 1x                                                                               |
| Injectie pijnremming post-op                                                                  | 2                    | 10 sec                                                                                                   | 6x/d                                                                             |
| <b>Ontwaken uit anesthesie na TAC-procedure</b>                                               | 5                    | 8-10 min                                                                                                 | 1x                                                                               |
| Leven met TAC ( kans op verminderde activiteit, long congestie, cachexie)                     | (3)-5                | Theoretisch mogelijk gans de TAC periode (i.e. max 10 wk afh van groep). In de praktijk vnl in week 8-10 | max 1x                                                                           |
| <b>Hair removal with 'veet' prior to short axis evaluation</b>                                | 2                    | 3-5 min                                                                                                  | Max 3x                                                                           |
| Short Axis evaluation                                                                         | 3                    | 3 min                                                                                                    | Max 3x                                                                           |
| Euthansia                                                                                     | 2                    | 3 min                                                                                                    | 1x                                                                               |

Vraag 18: Punt 10b- De DEC verzoekt het grijs gemarkeerde deel te verwijderen. De DEC wil graag een welzijnsevaluatie, gebaseerd op de bevindingen uit een gelijkaardige experimentele studie (TAC) in Maastricht.

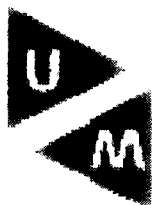
Antwoord vraag 18: Het grijze gedeelte werd verwijderd. De welzijnsevaluatie gebaseerd op een gelijkaardige studie in Maastricht is als volgt:

25% uitval (vnl tgv longcongestie)

Secundair hieraan werd vastgesteld dat de dieren de volgende gevolgen van HF konden vertonen: cachexia, verminderde activity, anorexia.

Vraag 19: In de SOP staat niet duidelijk vermeld hoe de TAC wordt uitgevoerd om zodoende een inschatting te kunnen maken om het ongerief in te kunnen schatten. De vraag hierover van de art.14 functionaris tijdens de screening is niet beantwoord. De DEC verzoekt dit alsnog te doen.

Antwoord vraag 19: Wij hebben toegevoegd aan dat de borstkas op een minimaal invasieve manier geopend zal worden nadat de 2<sup>de</sup> rib doorgeknipt wordt. Hierdoor – uit eigen ervaring- hebben we het beste zicht op de aorta en bijgevolg wordt de duur van de ingreep minimaal.



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, 19-07-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie van uw projectaanvraag: "*Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling*", is op de DEC vergadering van 15 juli 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- \* Bij punt 7c merkt de DEC op dat de berekeningen van de aantallen nog steeds niet juist zijn. De DEC stelt vast dat er gerekend wordt met een power van 90%, echter in de tabel wordt met 80% gerekend. Indien hiervoor gekozen wordt dient dit onderbouwd te worden. Verder moet de uitval berekend worden over de niet afgeronde aantallen per groep. N=6 is niet de uitleesparameter.
- \* Punt 8 (vraag 11 van de DEC)- De DEC is niet akkoord met uw antwoord. Randomisatie van groepen is wetenschappelijk beter verantwoord.
- \* De DEC wenste een beter gespecificeerde SOP.

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 2011-080, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

## Response to the DEC

Project 2011-080

Title "*Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling*"

### Comment 1

Bij punt 7c merkt de DEC op dat de berekeningen van de aantallen nog steeds niet juist zijn. De DEC stelt vast dat er gerekend wordt met een power van 90%, echter in de tabel wordt met 80% gerekend. Indien hiervoor gekozen wordt dient dit onderbouwd te worden. Verder moet de uitval berekend worden over de niet afgeronde aantallen per groep.  $N=6$  is niet de uitleesparameter.

### Response 1

We have corrected the statistical calculation according to the DEC's advice:

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

Delta = 0.25 en Sigma 0.15

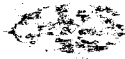
Met de formule van L. Sachs:  $n = 2(z\alpha/2 - z\pi)^2 * (\sigma/\delta)^2$

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

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

De spreiding ( $\sigma$ ) wordt geschat op 0.15%. Het beoogde effect ( $\delta$ ) wordt geschat op 0.25%.

Dit geeft:  $n = 15,7 * (0.15/0.25)^2 = 5.652$



Uitval wordt geschat op 0%

uival is 12.5%

$0.875a = 5.652$

$a = 5.652 / 0.875$

$a = 6.46$

Dus  $a = 6.46 \rightarrow$  afgerond dus  $n = 7$

#### Comment 2

Punt 8 (vraag 11 van de DEC)- De DEC is niet akkoord met uw antwoord. Randomisatie van groepen is wetenschappelijk beter verantwoord.

#### Response 2

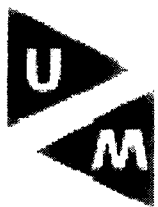
we will randomize groups according to the DEC's advice

#### Comment 3

De DEC wenste een beter gespecificeerde SOP.

#### Response 3

We have edited the SOP accordingly (see attachment)



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, 31-08-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie van uw projectaanvraag: *"Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling"*, is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de eerste 2 zinnen van de reading parameter (uitleesparameter) bij punt 7c te verwijderen en het grijs gemarkeerde deel te vermelden bij de eNOS uncoupling (read-out parameter) onder punt 7c.
- Tevens verzoekt de DEC de opmerking "uitval wordt geschat op 0%" te verwijderen. Dit is tegenstrijdig met de zin eronder "uitval is 12.5%".
- De DEC verzoekt de aanvraag na te kijken op taalfouten en deze aan te passen. (*droup out*)
- De DEC verzoekt bij punt 9a de naam te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat er verwezen wordt naar personen in de aanvraag in verband met de WOB. Dit is reeds eerder gemeld.
- De SOP correspondeert niet met punt 9a (de premedicatie zoals beschreven bij punt 9a) staat niet in de SOP. De DEC verzoekt dit aan te passen.

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 2011-080, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden op vragen 2011-080w

Vraag 1: De DEC verzoekt de eerste 2 zinnen van de reading parameter (uitleesparameter) bij punt 7c te verwijderen en het grijs gemarkeerde deel te vermelden bij de eNOS uncoupling (read-out parameter) onder punt 7c.

Antwoord 1: de eerste 2 zinnen werden verwijderd bij punt 7c en het grijs gemarkeerde werd verplaatst

Vraag 2: Tevens verzoekt de DEC de opmerking "uitval wordt geschat op 0%" te verwijderen. Dit is tegenstrijdig met de zin eronder "uitval is 12.5%".

Antwoord 2: Dit werd verwijderd

Vraag 3: De DEC verzoekt de aanvraag na te kijken op taalfouten en deze aan te passen. (*droup out*)

*Antwoord 3: De aanvraag werd nagekeken op taalfouten*

Vraag 4: De DEC verzoekt bij punt 9a de naam te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat er verwezen wordt naar personen in de aanvraag in verband met de WOB. Dit is reeds eerder gemeld.

Antwoord 4: De naam werd verwijderd

Vraag 5: De SOP correspondeert niet met punt 9a (de premedicatie zoals beschreven bij punt 9a) staat niet in de SOP. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Antwoord 5: Punt 9a incl premedicatie werd ingepast in de SOP.

Met vriendelijke groeten.

From:   
 Sent: donderdag 8 september 2011 9:56  
 To:   
 Subject: Project 2011-080-g

Geachte Onderzoeker,

Uw project "*Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling*", is door de DEC behandeld.

Uw project heeft een positief advies gekregen met uitzondering van de SOP, de officiële brief zal U per post worden toegestuurd.

Na ontvangst van de officiële, getekende brief, kan het CPV Uw werkprotocollen en dierbestellingen in behandeling nemen.

De SOP dient op een aantal punten nog aangepast te worden in overleg met de ProefdierGeskundige, onder andere:

- inductie anesthesie
- keuze hechtmateriaal
- keuze oogzalf
- benadering aorta hoog

De DEC verzoekt u dit zo spoedig mogelijk in orde te maken en de SOP aan het secretariaat DEC te sturen.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

  
 Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616- 6200 MD Maastricht  
 T  
 E-mail:

Werktijden



Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht  
08-09-2011

*Project: Effects eNOS transcription-enhancer on prevention and reversion of pressure-overload induced myocardial dysfunction by modulating eNOS-uncoupling.*

DEC-UM  
Voorzitter DEC-UM  
n  
p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

*Secretariaat DEC-UM*

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

Bezoekadres

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

Postadres  
Postbus 616  
6200 MD Maastricht

De SOP dient op een aantal punten nog aangepast te worden in overleg met de Proefdierdeskundige, onder andere:

- inductie anesthesie
- keuze hechtmateriaal
- keuze oogzalf
- benadering aorta hoog

De DEC verzoekt u dit zo spoedig mogelijk in orde te maken en de SOP aan het secretariaat dec te sturen.

Projectnummer: 2011-080  
Diersoort: muis  
Aantal dieren: 77  
Einddatum: 07-09-2015



Project 2011-080

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