

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC-UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-083

Ontvangen: 29-09-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
05-10-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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:

Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced heart failure

startdatum	01/10/2011

einddatum	01/11/2012

Duur van de proef¹⁰: 14 weeks (dit is de langste duur dat een dier in het chron exp blijft, incl de 1wk pretreatment)

Naam

Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)

E-mailadres

Bevoegdheid⁵

Cap. groep /afdeling

1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)
2. Vervanger VO (VVO)
3. (VM) GGO⁷
4. Overige uitvoerenden
5. Overige Uitvoeren
6. WB/punt⁶

	Art.9, PI
	Art. 9
	Art.9
	Art 12
	Wetenschappelijk beoordeelbaar/vakgroepvoorzitter

Diergroep	1	2	3	4
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Ctrl/exp/sham	Dox 8 day + AVE3085 (3 mg/Kg/day)	Dox 8 day (acute) + AVE3085 (30 mg/Kg/day)	Dox 8 day (acute) + AVE3085 (300 mg/Kg/day)	Dox 24 hour (acute) + AVE3085 (30 mg/Kg/day)
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	9	9	9	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 *	05	05	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01

Diergroep	5	6	7	8	9	10
	Group 5	Group6	Group7	Group 8	Group 9	Group 10
Ctrl/exp/sham	Dox 13 week (chronic) + AVE3085 (3 mg/Kg/day)	Dox 13 week (chronic) + AVE3085 (30 mg/Kg/day)	Dox 13 week (chronic) + AVE3085 (300 mg/Kg/day)	Dox 24h (Acuut) + placebo	Dox 8d (Acuut) + placebo	Dox 13 week (chronic) + placebo
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	9	9	9	6	13	10
Geslacht	M	M	M	M	M	M
Dieren immuuncompetent ?	Yes	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	age 9-11wk, 21-24 g body 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 *	01	01	01	01	01	01
Pijnbestrijding *	02	02	02	02	02	02
Mate ongerief *	05	05	05	05	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01

Diergroep	I1	I2				
	Group I1	Group I2				
Ctrl/exp/sham	No doxo, no AVE (placebo)	No doxo, AVE 30 mg/kg/d				
Diersoort	Mice	Mice				
Stam	C57Bl/6	C57Bl/6				
Construct / mutatie ?	No (WT)	No (WT)				
Herkomst (leverancier) *						
Aantal	6	6				
Geslacht	M	M				

Dieren immuuncompetent ?	Yes	Yes				
Leeftijd/gewicht	age 9-11 wk, 21- 24 g body wt	age 9-11 wk, 21- 24 g body wt				
Doel van de proef *	31	31				
Belang van de proef *	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01				
Bijzondere technieken *	01	01				
Anesthesie *	01	01				
Pijnbestrijding *	01	01				
Mate ongerief *	01	01				
Toestand dier einde exp*	01	01				

1 Verantwoording

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

Titel: "Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced heart failure"

1. Doel van de proef.

Background: Doxorubicin is a very effective anti-neoplastic agent. Unfortunately, its use has been hampered by cardiotoxic side effects which manifest in a wide range, from acute arrhythmias until chronic overt heart failure (HF). Oxidative stress has been authenticated as the major pathogenetic mechanism in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthesis (eNOS) has been observed as a pivotal source of reactive oxygen species (ROS) generation in doxorubicin-induced HF. AVE3085, an eNOS transcription enhancer, is designed to selectively upregulate eNOS transcription and enhance eNOS coupling. Several studies reported its vasoprotective effect in atherosclerosis (Wolfhart et al. 2008) and hypertensive model (Yang et al. 2011). However, the effect of AVE3085 to prevent and/or reverse doxorubicin-induced ROS generation and subsequently improved cardiac function has not been investigated yet.

Objectives: Primary endpoint of this project is to unravel the effects of AVE3085 on eNOS coupling in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity and chronic myocardial dysfunction. Secondary endpoints are: dose-response effect of AVE3085 on dox induced cardiotoxicity (incl excluding bimodal doseresp) and NOS-uncoupling dep superoxide.

Approach: To approach this research questions C57Bl6 mice (n= 101) will be divided to acute and chronic doxorubicin experiment, and will receive AVE3085 (3, 30 and 300 mg/ kg body weight /day) from 7 days before the experiment until sacrifice time (acute = 24 hours or 10 days; chronic = 13 weeks). Placebo and control experiments are included.

Remark: This study is part of the VIDI-program and is linked on a previous study on DEC 2010-007. In DEC 2010-007 we have demonstrated by modulating eNOS with folic acid has significantly attenuate doxorubicin-induced cardiomyopathy and mortality. Here, in this project we investigate another approach to modulate eNOS in doxo-induced cardiotoxicity.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



- ↓ Doxorubicin, a highly efficacious anti-neoplastic agent and worldwide used in children and adults, has inevitable cardiac side effects. The prevalence of early clinical cardiotoxicity is approximately 1.6% of all children treated with doxorubicin; meanwhile, the prevalence of late cardiotoxicity has been stated to be more than 17%, which means patients survive their cancer but dying from heart failure.
- ↓ Oxidative stress has been authenticated as major mechanism in the pathogenesis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. However many researches using antioxidant therapy has unsuccessful results. We have preliminary evidence that NOS-dependent ROS has a pathogenetic role in doxorubicin-induced cardiotoxicity and with modulate eNOS in coupled state can prevent doxorubicin-induced superoxide generation without affecting the anti-tumor effects of doxorubicin.

3. Alternatieven

We are well-aware of the discomfort (anorexia to death) that is caused by administration of doxorubicin to the mouse. Unfortunately, there is no change, reduction or adaptation possible to investigate doxorubicin-induced cardiotoxicity. Cell-culture is not possible to determine the goals of this particular study. No human material can be made available on an ethical way to explore the effect of AVE3085 on eNOS-uncoupling in doxorubicin-induced cardiotoxicity. There are no alternatives for the use of mice in this project regarding eNOS-uncoupling and doxorubicin-induced cardiac dysfunction.

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 2010-007)

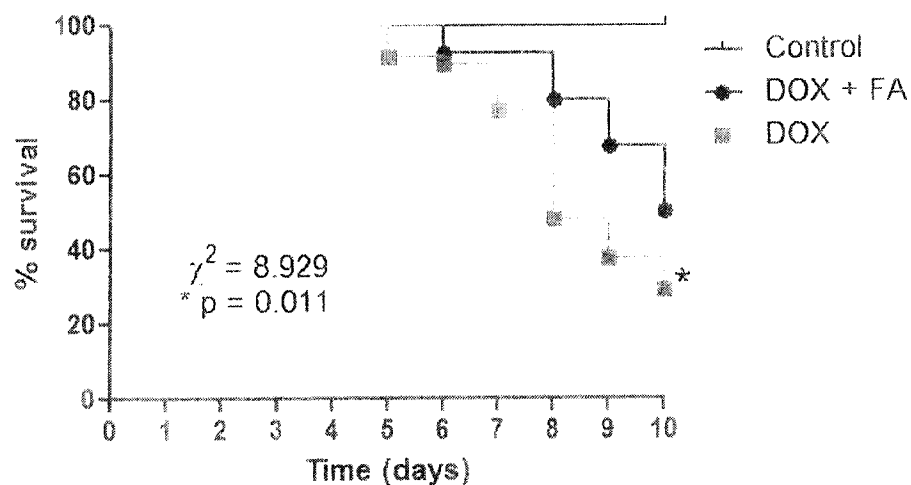
4. Ethische afweging

- ↓ Doxorubicin-induced heart failure is a very confronting reality in the clinic: Patients did survive their cancer, but did develop terminal heart failure.
- ↓ Very little is known about the pathogenetic mechanisms of this disease
- ↓ At this moment, NO curative treatment available.
- ↓ Heart failure is a terminal heart disease, however we recently demonstrated that recoupling 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 doxorubicin-failing heart.
- ↓ The use of mice, the indicated numbers and the expected mortality are justified.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Background: Doxorubicin is a well-established and highly efficacious anti-neoplastic agent which belongs to the family of anthracyclines, along with daunorubicin, epirubicin, and idarubicin. It is used to treat several adult and pediatric cancers, such as solid tumours, leukaemia, lymphomas and breast cancer. Besides the conventional toxicities such as hematopoietic suppression, nausea, vomiting, extravasation, and alopecia, the successful use of doxorubicin has been hampered by cardiotoxicity, which characterized by a broad spectrum of symptoms ranging from asymptomatic ECG-changes, over myocarditis, to decompensated cardiomyopathy.

Oxidative stress is already legitimated as major mechanism in doxorubicin-induced cardiotoxicity pathogenesis. However, many studies using antioxidant as its therapy has failed reach end points, indicating that we urgently need improvement in doxorubicin-induced cardiotoxicity treatment. 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. Neilan et al. showed that genetic disruption of eNOS transcription protects against the doxorubicin-induced cardiac dysfunction, injury and mortality. In addition, our preliminary data showed that the eNOS modulator folic acid 0.4mg/g/day can delay and reduce acute doxorubicin-induced mortality.



20 mg/kg, single dose

This all indicating, modulating eNOS coupled is an attractive and innovative therapeutic approach in the doxorubicin-induced cardiotoxicity. Recent studies have demonstrated that AVE3085 showed concomitant the increase in eNOS transcription and eNOS protein levels and BH4 levels in animal models of atherosclerosis and hypertension. 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.

Objectives: Primary endpoint of this project is to unravel the effects of AVE3085 on eNOS coupling in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity and chronic myocardial dysfunction.

Secondary endpoints are: dose-response effect of AVE3085 on dox induced cardiotoxicity (incl excluding bimodal doseresp) and NOS-uncoupling dep superoxide.

Explanation of the necessity of the different groups: The acute (24h, 10d) and chronic-model represents different clinical situations with a complete different pathology. Acute doxo is clinically characterized by arrhythmia's, subacute by periyocarditis and chronic doxo treatment by myocardial dysfunction. Therefore we need these different models of doxo-administration. **The different dosage are needed because of the need to exclude the presence (or absence) of a bimodal dose-response curve, which has been demonstrated with another eNOS-modulator (Moens et al. JMCC 2011). A bimodal doserespons-curve indicates a small therapeutic window, which is very important information to safely extrapolate these results to the clinic.**

6. Wetenschappelijke beoordeling

- ⬇ This DEC project has been scientifically reviewed and agreed by _____, letter 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.

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Species: mice.

Stam: c57bl6

Herkomst: resp. Charles River.

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

7b. Sexe

Male: Estrogens does have a cardioprotective affect in heart failure models. It has been described that estrogen signalling interferes with NO-signalling in the heart

7c. Aantallen

Drop-out:

The drop-out rate for the placebo-treated group at 24h is 0% (group 8) and at 8d (group 9) of doxo treatment is 55%. These percentage came out of our previous DEC 2010-007.

We do expect that the drop-out rate for the AVE treated animals at 24h (group 4) will also be 0% and after 8d (group 1,2 and 3) will be reduced. We can not calculate exactly this expectation. A reduced drop-out of 30% (in case of 55%) is however realistic after treatment with AVE in group 1, 2 and 3.

For chronic (group 5, 6, and 7) the drop out is expected 30% for the AVE-treated animals and 40% for the placebo treated animals (group 10).

The drop-out for group 11 and 12 (resp no doxo and no AVE and no doxo AVE 30 mg/kg/d) is 0%

Unfortunately, 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.

Calculation number/group:

Voor in eNOS uncoupling (read-out parameter zie objectives p.1) 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% (group 4, 8, 11 en 12): dus n afgerond = 6

Indien uitval 40 % (group 10).

$$0.45 a = 5.652$$

$$a = 5.652/0.6$$

$$a = 9.42$$

afgerond dus n = 10

Indien uitval 30% (group 1,2, 3, 5, 6 en 7) :

$$0.7 a = 5.652$$

$$a = 5.652/0.7$$

$$a = 8.074$$

afgerond dus n = 9

Indien uitval 55 % (group 9). Zie figuur 5 voor uitval op 8d (45% survival, 55% uitval)

$$0.45 a = 5.652$$

$$a = 5.652/0.45$$

$$a = 12.56$$

afgerond dus n = 13

$$\rightarrow \text{Total } n = 9+9+9+6+9+9+9+6+13+10+6+6=\underline{101}$$

Explanation of the different groups:

The acute (24h, 10d) and chronic-model represents different clinical situations with a complete different pathology. Acute doxo is clinically characterized by arrhythmia's, subacute by periyocarditis and chronic doxo treatment by myocardial dysfunction. Therefore we need these

different models of doxo-administration.

Different dosage: We need to exclude the presence (or absence) of a bimodal dose-response curve, which has been demonstrated with another eNOS-modulator (Moens et al. JMCC 2011). A bimodal doserespons-curve indicates a small therapeutic window, which is very important information to safely extrapolate these results to the clinic.

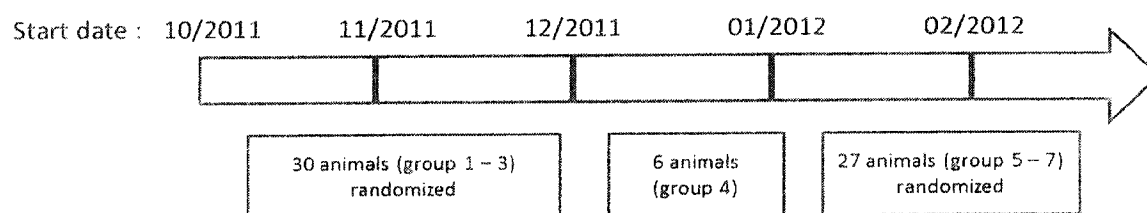
8 Dierproef

8. Experiment

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	11
Type of experiment	Acute	Acute	Acute	Acute	Chronic	Chronic	Chronic	Acute	acute	Chronic	No doxo	No doxo
Duration of doxo	8 days	8 days	8 days	24 hours	13 weeks	13 weeks	13 weeks	24h	8d	13 weeks	n/a	n/a
Dose of AVE3085 (mg/kg/day)	3	30	300	30	3	30	300	placebo	placebo	placebo	placebo	30
n total	9	9	9	6	9	9	9	6	13	10	6	6

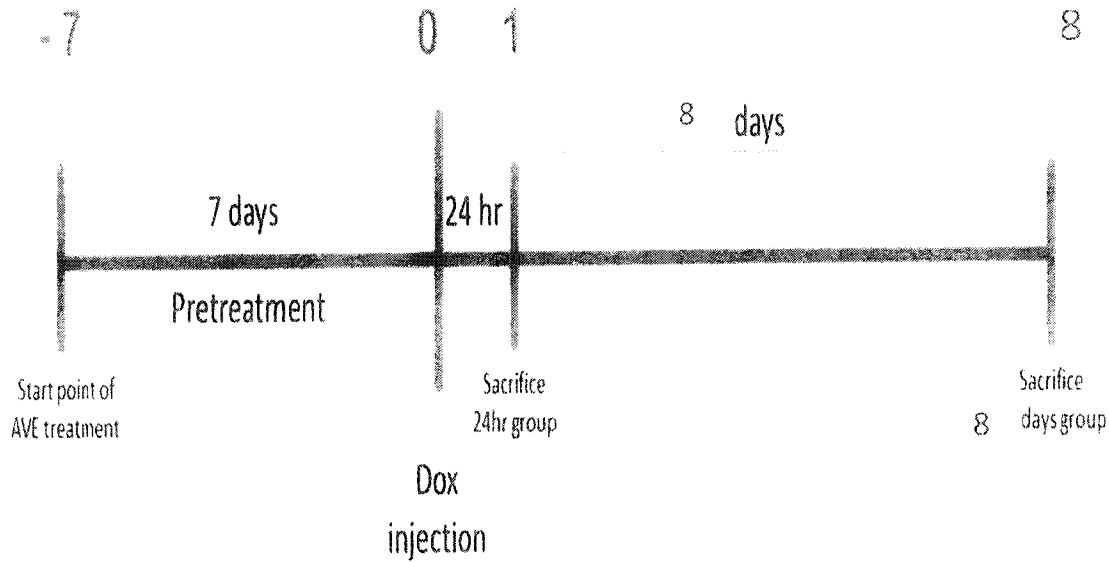
AVE3085 is mixed in transgenic dough similar to Moens et al. Circulation May 2008.

Experiment will start at 10/2011

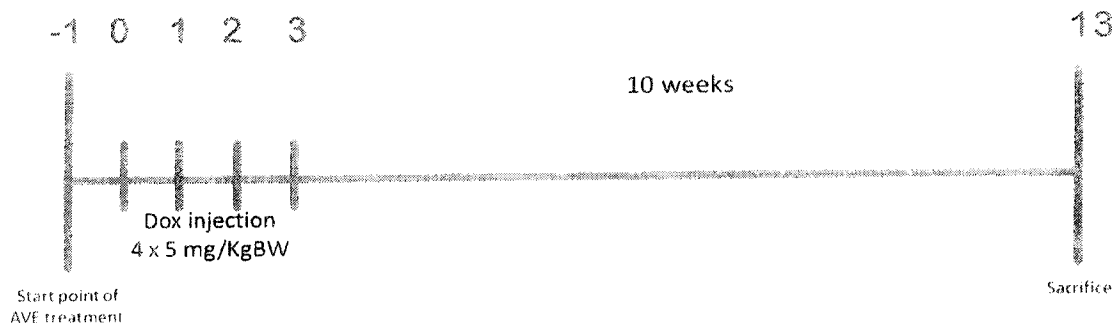


Experimental plan

Acute experiment



Chronic experiment



Echocardiogram (chronic groups): week 0, 5, 10, 13

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Niet van toepassing/ Not applicable.

9b. Pijnbestrijding

Niet van toepassing/ Not applicable, because not compatible with experiment. Euthanasia will be performed if required (see 9c, i.e. before Moribund state). We mention pain code 02, because this model (cardiotoxicity-model) is investigating the toxicity caused by doxorubicin.

From (Johns Hopkins 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. This can be explained by a too direct effect of doxo on the myocardium when used IV (and less when used ip because this needs absorption). We will keep track of new methods (e.g. osmotic pump) to reduce variance and mortality.

Additional analgesia is not possible due to the study-protocol. This study protocol mimics the clinical situation in which patients are receiving doxorubicin and getting heart failure. In the clinical situation patients are not getting analgesia as a standard treatment for their heart failure. In addition because this is a pharmacokinetic study, no possible drug interactions are allowed (interactions with doxo, endothelial and myocyte biology).

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: (see also well-fare-scoring below)

- ↓ 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

- ↓ 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.
- ↓ 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.

10a. Ongerief**Acute experiments:**

In the acute group: doxorubicin will be given 1x (20 mg/kg) i.p. (Code 3).

→ total amount of discomfort: Code 5

	Discomfort	Freq	Duration
Injection (ip):	Code 3	1x	1-5sec
Consequences of injection (i.e. living with doxo cardiotox):	Code 5	1x	Variable (no estimation possible), max. 8d
Euthanasia:	Code 2	1x	3 min

Chronic experiments:

In the chronic group: doxorubicin will be given 4x (5 mg/kg) i.p. (Code 4).

→ total amount of discomfort: Code 5

	Discomfort	Freq	Duration
Injection (ip):	Code 4	4x	1-5sec
Consequences of injection (i.e. living with doxo cardiotox):	Code 5	1x	Variable (no estimation possible), max. 13 weeks
Euthanasia:	Code 2	1x	3 min
Short axis evaluation	Code 3	4x	2-3 min

Remark: In the acute experiment we will use 1x ip injection, in chronic experiment we will use 4x ip injections

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.

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 a in severity)

Body wt yesterday

Body wt today

Body wt change

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

Circular movement

Seizures

Paralysis

Animal will be euthanized before they reach the moribund state.

Remark: There are no direct related previous findings regarding AVE3085 on doxo. However, from DEC 2010-007 we know that modulating eNOS significantly delays and reduced doxorubicin-induced cardiotoxicity.

11. Verzorging en huisvesting

Protection against doxorubicin-metabolites in the secretory system.

Housing : cfr -doxo guidelines. Animals will be housed in groups of 2-3 animals/cage. 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.

12. Deskundigheid

are very experienced in this type of protocol

13. Standard Operation Procedures (SOP)

See attachment (SOP DOX experiment.doc, this is identical to the dox SOP's that were used before at this institute (after approval DEC).

Relevante literatuur

See attachment (Neilan et al. and Wolfhart et al.)



Standard Operation Procedure

i.p. injection doxorubicin 5 (chronic) or 20 (acute) mg/kg. In the chronic protocol the i.p. injection will be repeated 4 times (once a week). In the acute protocol, there is only one i.p. injection.

Doxorubicin will be dissolved in NaCl 0.9%.

At the end of the experiment (after 24h/10d for the acute protocol and after 13wk for the chronic protocol) the animals will be placed under isoflurane anesthesia and then an overdose of isoflurane (more than 5%) will be given.



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

Maastricht, 7 juli 2011

Betreft: Projectnummer 2011-083

Directeur

Geachte

Hierbij bevestig ik, , dat het project met
projectnummer 2011-083

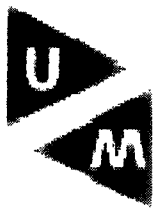
*"Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced
heart failure"*

wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd is.

In de hoop u voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Hoofd afdeling Cardiologie



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,

Uw projectaanvraag: "*Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced heart failure*", 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:

- Bij punt 6 verzoekt de DEC te vermelden dat "This DEC proposal (2011-083) is reviewed and approved by..". De DEC wenst een gesignde brief van met vermelding van het DEC protocol nummer(2011-083) en geen kopie van de brief.
- Voor commentaar verzoekt de DEC de opmerkingen van project 2011-080 en 2011-081 te gebruiken en de aanvraag nog eens goed na te kijken en waar nodig te corrigeren.

Conclusie:

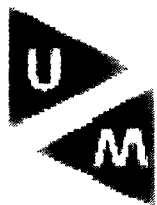
Het project wordt aangehouden.

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 2011-083, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



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 versies van uw aanvragen 2011-082/2011-083/2011-084 en 2011-085 zijn niet behandeld (dus nog aangehouden) tijdens de vergadering van 15 juli 2011.

De DEC verzoekt u eerst project 2011-080 en 2011-081 aan te passen.

De vragen gesteld bij deze projecten zijn ook van toepassing op de andere aanvragen en de DEC verzoekt dan ook deze aanvragen aan te passen.

Bijgevoegd vindt u een excelsheet die u kunt gebruiken bij de berekening van de aantallen.

De DEC verzoekt u niet te verwijzen naar personen (bijvoorbeeld). Dit is voor de DEC niet relevant om te weten en in verband met de Wet-openbaarheid-van bestuur ook niet handig om te doen.

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

Vraag 1: De DEC-UM ziet niet hoe de gekozen opzet van het onderzoek correspondeert met de doelstelling van dit onderzoek.

Antwoord 1: Wij begrijpen de onduidelijkheid en hebben de objectives/eindpunten meer in detail beschreven: "Objectives: Primary endpoint of this project is to unravel the effects of AVE3085 on eNOS coupling in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity and chronic myocardial dysfunction. Secondary endpoints are: dose-response effect of AVE3085 on dox induced cardiotoxicity (incl excluding bimodal doseresp) and NOS-uncoupling dep superoxide."

Vraag 2: Bij punt 6 verzoekt de DEC te vermelden dat "This DEC proposal (2011-084) is reviewed and approved by..". De DEC wenst een gesignde brief van , met vermelding van het DEC protocol nummer (2011-084) en geen kopie van de brief.

Antwoord 2: Deze brief is digitaal toegevoegd en dit is ook vermeld op het voorblad.

Vraag 3: Voor commentaar verzoekt de DEC de opmerkingen van project 2011-080 en 2011-081 te gebruiken en de aanvraag nog eens goed na te kijken en waar nodig te corrigeren.

Antwoord: Wij hebben volgende punten aangepast in deze finale versie:

- Statistische onderbouwing confirm email DEC dd 20 Juli 2011
- Well-fare scoring
- Omzetting ongerief score in tabel
- Onderbouwing waarom eNOS-uncoupling reading parameter is (zie objectives/endpoints in punt 1 and 5)
- Verduidelijking morfine ook als premedicatie en 2d post-op 6x/d
- Hecalculatie n ifv dropout
- Vermelding rationale in 'verminderde' dropout (verwijzing naar eerdere DEC aan dit instituut)
- Beoordeling door -commissie werd verwijderd
- Randomizatie werd toegevoegd



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

orzitter
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: "*Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced heart failure*", is op de DEC vergadering van 26 augustus 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * In punt 3 alternatieven wordt gemeld dat de controle en placebo groep niet worden ingezet. Dit is vanuit wetenschappelijk oogpunt een risico. Er zal in de tijd altijd een zekere 'drift' optreden (bijvoorbeeld door genetische drift in de muizen, veranderde omstandigheden, etc) en de gehele afwezigheid van de controle groepen is af te raden. De DEC realiseert zich dat dit proeven met ernstig ongerief zijn en elke reductie in aantallen moet aangegrepen worden, dit kan echter niet ten koste gaan van de wetenschappelijke kwaliteit, immers dan kan het ongerief van alle dieren niet meer afgewogen worden t.o.v. de wetenschappelijke waarde. In combinatie met de hierna genoemde punten is de DEC van mening dat met min of meer gelijke aantallen, en minder ongerief, een experiment opgezet kan worden, inclusief controle en placebo groepen.
- * De DEC is van mening dat het experiment verfijnd kan worden. Uit eerdere experimenten is duidelijk dat dox-behandeling leidt tot hartfalen. Dit is een proces dat enige tijd in beslag neemt, zoals te zien in Figuur van punt 5. Aangezien de onderzoeker steeds van mening is dat de doelstelling is om het effect van de interventie (AVE3085) op de e-NOS ontkoppeling (= uitleesparameter) vast te stellen, stelt de DEC voor om op dag 8 het experiment te beëindigen. Op dit tijdstip is het verschil tussen de interventie-groepen groter (grotere delta), is er minder uitval en minder ongerief voor de dieren. Derhalve zullen minder dieren geïncubeerd hoeven te worden, wat de onderzoeker in de gelegenheid stelt om ook de controle en placebo groepen te includeren.
In DEC 2011-085 wordt dezelfde stof uitgetest in *in vitro* experimenten. De DEC adviseert de data te gebruiken om te komen tot een reductie van groepen in het *in vivo* experiment (d.w.z. gebruik van alle dosissen in het *in vivo* experiment (met hoog ongerief) ligt niet voor de hand).

- Punt 8. De DEC vraagt zich af waarom geen echo wordt gemaakt in het acute experiment? Dit betreft een nieuwe interventie (AVE3085) waarvan ook het effect op hartfunctie vastgesteld (of in ieder geval gecontroleerd) dient te worden. In deze context merkt de DEC op dat het ethisch onverantwoord is als niet zorgvuldig wordt nagegaan of alle mogelijke data uit een experiment kan worden verkregen, in dit geval is een echo haalbaar en gegeven extra ongerief ethisch verantwoord.
- Bij punt 9a merkt de DEC op dat anesthesie wel van toepassing is. De DEC verzoekt dit aan te passen (ook op voorblad).
- De DEC verzoekt het voorblad in overeenstemming te brengen met punt 9b en verzoekt tevens '(and less wgen, enzovoort)' uit te leggen.
- De DEC merkt op dat de echo niet genoemd wordt bij het ongerief punt 10a. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

De DEC heeft lang gediscussieerd over de opzet van de proef en het verzamelen van data en verfijning van het model. De DEC mist de onderbouwing voor de gemaakte keuzes. De DEC wijst erop dat door alle onvolkomenheden in de aanvragen, de DEC disproportioneel veel tijd kwijt is aan de voorbereiding en behandeling van de aanvragen.

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 2011-083, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden op de vragen betreffende DEC 2011-083

Vraag 1: In punt 3 alternatieven wordt gemeld dat de controle en placebo groep niet worden ingezet. Dit is vanuit wetenschappelijk oogpunt een risico. Er zal in de tijd altijd een zekere 'drift' optreden (bijvoorbeeld door genetische drift in de muizen, veranderde omstandigheden, etc) en de gehele afwezigheid van de controle groepen is af te raden. De DEC realiseert zich dat dit proeven met ernstig ongerief zijn en elke reductie in aantallen moet aangegrepen worden, dit kan echter niet ten koste gaan van de wetenschappelijke kwaliteit, immers dan kan het ongerief van alle dieren niet meer afgewogen worden t.o.v. de wetenschappelijke waarde. In combinatie met de hierna genoemde punten is de DEC van mening dat met min of meer gelijke aantallen, en minder ongerief, een experiment opgezet kan worden, inclusief controle en placebo groepen.

Antwoord 1: Wij zijn het volledig eens met de DEC en hebben controle en placebo-groepen toegevoegd. Bijkomend, aangezien de duur van het experiment op aanraden van de DEC gereduceerd wordt naar 8d (ipv 10d) kunnen de placebo-10d gegevens uit vorige experimenten niet gebruikt worden. We hebben groep 8, 9 en 10 toegevoegd resp dox 24h+plac, dox 8d + plac en chron dox + plac en groep 11 en 12 als controle exp (no doxo met resp placebo en AVE)

Vraag 2: De DEC is van mening dat het experiment verfijnd kan worden. Uit eerdere experimenten is duidelijk dat dox-behandeling leidt tot hartfalen. Dit is een proces dat enige tijd in beslag neemt, zoals te zien in Figuur van punt 5. Aangezien de onderzoeker steeds van mening is dat de doelstelling is om het effect van de interventie (AVE3085) op de e-NOS ontkoppeling (= uitleesparameter) vast te stellen, stelt de DEC voor om op dag 8 het experiment te beëindigen. Op dit tijdstip is het verschil tussen de interventie-groepen groter (grotere delta), is er minder uitval en minder ongerief voor de dieren. Derhalve zullen minder dieren geïncludeerd hoeven te worden, wat de onderzoeker in de gelegenheid stelt om ook de controle en placebo groepen te includeren.

Antwoord 2: Akkoord wij reduceren de duur van het acute experiment tot 8d en hebben de aantallen ifv van de uitval aangepast.

Vraag 3: In DEC 2011-085 wordt dezelfde stof uitgetest in *in vitro* experimenten. De DEC adviseert de data te gebruiken om te komen tot een reductie van groepen in het *in vivo* experiment (d.w.z. gebruik van alle dosissen in het *in vivo* experiment (met hoog ongerief) ligt niet voor de hand).

Antwoord 3: Het myocard bestaat uit hartspiercellen (myocyten) en endotheelcellen. Het is beschreven (Moens et al. Circulation 2008) dat er een interactie bestaat inzake eNOS tussen endotheelcellen en myocyten. DEC-085 bestudeert enkel het effect van AVE op geïsoleerde myocyten. Deze DEC (2011-083) bestudeert het *in vivo* effect van AVE op toxisch myocard, dat dus myocyten en endotheelcellen bevat.

Vraag 4: Punt 8. De DEC vraagt zich af waarom geen echo wordt gemaakt in het acute experiment? Dit betreft een nieuwe interventie (AVE3085) waarvan ook het effect op hartfunctie vastgesteld (of in ieder geval gecontroleerd) dient te worden. In deze

context merkt de DEC op dat het ethisch onverantwoord is als niet zorgvuldig wordt nagegaan of alle mogelijke data uit een experiment kan worden verkregen, in dit geval is een echo haalbaar en gegeven extra ongerief ethisch verantwoord.

Antwoord 4: De hoofdrede waarom wij initieel geen echo aangevraagd hebben tijdens de acute experimenten is dat er geen echocardiografische afwijkingen vaststelbaar zijn tijdens acute doxo-geïnduceerde cardiotoxiciteit. Bij chron experimenten zijn deze afwijkingen wel zichtbaar. Gezien de minimale toename in ongerief hebben wij nu short-axis evaluaties voorzien in de acute experimenten zoals gevraagd door de DEC en is dit ook vermeldt bij het ongerief.

Vraag 5: Bij punt 9a merkt de DEC op dat anesthesie wel van toepassing is. De DEC verzoekt dit aan te passen (ook op voorblad).

Antwoord 5: Anaesthesie is niet van toepassing. Ik vermoed dat het onderscheid tussen een short axis evaluatie (2 min max, zonder anaesthesie, enkel echoprobe plaatsen en foto maken) en een volledig echocardiografisch onderscheid (20-30 min, onder anaesthesie) mogelijks niet duidelijk is. Wij doen enkel een korte as evaluatie (in de kliniek ook wel quick echocardio genoemd, en hiervoor is geen anaesthesie nodig. Ik licht dit gaarne nog in detail mondeling toe aan de DEC, mocht dit gewenst zijn.

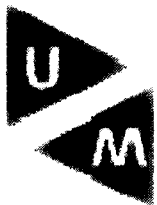
Vraag 6: De DEC verzoekt het voorblad in overeenstemming te brengen met punt 9b en verzoekt tevens '(and less wgen, enzovoort)' uit te leggen.

Antwoord 6: We hebben de pijstilling (not possible because not compatible with proof) aangepast op voorblad en hebben wgen vervangen door when.

Vraag 7: De DEC merkt op dat de echo niet genoemd wordt bij het ongerief punt 10a. De DEC verzoekt dit aan te passen.

Antwoord 7: Dit is aangepast.

Vriendelijke groeten,



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

AZM

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

Uw referentie:

Onze referentie

Maastricht, 28-09-2011

Geachte Onderzoeker,

De herziene versie van uw projectaanvraag: "*Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced heart failure*", is op de DEC vergadering van 23 september 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC adviseert de einddatum wat ruimer te nemen.
- Op het voorblad "overige uitvoerende" aanpassen in Pl.
- Bij het ongerief, punt 10a, dient "10 dagen" aangepast te worden in "maximaal 8 dagen".
- Uw antwoord 4- punt 8 DEC- Naar aanleiding van de beantwoording van vraag 4 merkt de DEC het volgende op: Indien er geen bruikbare informatie zal voortvloeien uit toepassing van deze techniek, zoals u in uw brief heeft aangegeven, stelt de DEC voor, gezien het te verwachten extra ongerief dat de dieren zouden ondergaan deze handeling (echo) toch niet toe te passen en dus niet op te nemen in het protocol.

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 2011-083, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Antwoorden op vragen betreffende DEC 2011-083

Vraag 1: De DEC adviseert de einddatum wat ruimer te nemen.

Antwoord1: Wij hebben de einddatum ruimer genomen i.e. 1/11/2012

Vraag 2: Op het voorblad "overige uitvoerende" aanpassen in PI.

Antwoord 2: (VO) is PI dat is aangepast. De 'overige uitvoerende' is geen PI maar wetenschappelijk beoordeelaar. Dit is aangepast.

Vraag 3: Bij het ongerief, punt 10a, dient "10 dagen" aangepast te worden in "maximaal 8 dagen".

Antwoord 3: 10d werd aangepast in 8d maximaal.

Vraag 4: Uw antwoord 4- punt 8 DEC- Naar aanleiding van de beantwoording van vraag 4 merkt de DEC het volgende op: Indien er geen bruikbare informatie zal voortvloeien uit toepassing van deze techniek, zoals u in uw brief heeft aangegeven, stelt de DEC voor, gezien het te verwachten extra ongerief dat de dieren zouden ondergaan deze handeling (echo) toch niet toe te passen en dus niet op te nemen in het protocol.

Antwoord 4: Echo werd verwijderd uit punt 8 en 10a.

PI & VO

Aan:

Ons kenmerk Doorkiesnummer Maastricht
05-10-2011

Project: *Effect eNOS transcription enhancing on doxorubicin-induced heart failure.*

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.

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-083
Diersoort: muis
Aantal dieren: 101
Einddatum: 05-10-2015

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